TEIL I

SYNTHESE UND UNTERSUCHUNG POTENTIELL WIRKSAMER HYDROLASEN MIT THIOPHENOL- UND IMIDAZOLGRUPPEN

TEIL II

CHROMATOGRAPHISCHE RACEMATTRENNUNGEN AN POLYAMIDADSORBENTIEN UND CELLULOSETRIACETAT

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

HILDEGUNDE MARKGRAF
aus

HELMSTEDT

BONN 1980

TEIL I

SYNTHESE UND UNTERSUCHUNG POTENTIELL WIRKSAMER HYDROLASEN MIT THIOPHENOL- UND IMIDAZOLGRUPPEN

TEIL II

CHROMATOGRAPHISCHE RACEMATTRENNUNGEN AN POLYAMIDADSORBENTIEN UND CELLULOSETRIACETAT

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Mathem.-Naturw. Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu
BONN

vorgelegt von

HILDEGUNDE MARKGRAF
aus
HELMSTEDT

BONN 1980

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. G. Blaschke

2. Referent: Prof. Dr. H. J. Roth

Tag der mündlichen Prüfung:

Pharmazeutisch Chemisches Institut der Universität Bonn

Direktor: Prof. Dr. H. J. Roth

Druck: Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn

UNIV. LEIDEN BIBL.

In der vorliegenden Dissertation werden zwei Themen bearbeitet.

Der erste Teil (Seite 4 - 81) befaßt sich mit Untersuchungen potentiell wirksamer künstlicher Hydrolasen mit Thiophenol und Imidazolgruppen.

Die erhaltenen Befunde zeigten, daß die Zielvorstellungen auf dem geplanten Weg nicht erreichbar waren. Das Arbeitsgebiet wurde abgeschlossen.

Im zweiten Teil (Seite 82 - 265) werden chromatographische Racemattrennungen an Polyamidadsorbentien und Cellulosetriacetat durchgeführt.

TEIL I:

Inhaltsverzeichnis

THEORETISCHER TEIL

		Seite
A.	Einleitung und Problemstellung	8
	I. Wirkweise einer natürlichen Hydrolase am Beispiel des Chymotrypsins	8
	II. Bisherige Versuche zur Synthese künstlicher Enzyme	10
	III. Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe	14
	IV. Ziel der vorliegenden Arbeit	20
B.	Polymere mit katalytisch wirksamen funktionellen Gruppen	21
	I. Theoretische Grundlagen zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten	21
	II. Synthese, Charakterisierung und Prüfung der potentiellen katalytischen Wirkung der Polymeren	22
	1. Polyethyleniminderivate	22
	a) Thiophenolhaltige Polyethyleniminderivate	23
	b) Polyethyleniminderivate mit Alkylgruppen und Imidazol	27
	c) Trifunktionelles Polyethyleniminderivat	32
	2. Polyvinylaminderivate	32
	a) Synthese der Matrix	33
	b) Polyvinylaminderivate mit zwei funktionellen Gruppen	34
	c) Trifunktionelles Polyvinylaminderivat	36
C.	Begründung des Scheiterns dieser Versuche	39

Seite

D. Wiederholung der Messungen im Mizellarsystem und Diskussion 41

I. Untersuchungen mit dem Zwischenprodukt der p-Nitrophenylacetatkinetik 41

II. Messungen mit der analytisch reinen Imidazolmizelle 44

E. Zusammenfassung 50

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Allgemeine Methoden 51

I. Verwendete Geräte 51

II. Allgemeine Meßmethoden 52

1. Quantitative Bestimmungen von SH- und S-S-Gruppen 52

2. Kinetikmessung 53

B. Polyethyleniminderivate 54

I. Thiophenolhaltige Polyethyleniminderivate 54

1. Trocknung von Polyethylenimin 54

2. Synthese der Thiophenolkomponente 54

3. Darstellung der Polyethyleniminderivate (Poly 1-3) 55

4. Charakteristik des Polymeren 1 57

5. SH- und S-S-Gruppenbestimmungen des Polymeren 1 57

6. Hydrolytische Aktivität des Polymeren 1 gegenüber p-Nitrophenylacetat 59

Seite

II. Polyethyleniminderivate mit Alkylgruppen und Imidazol 60

1. Synthese der Polymeren 4-6 60

2. Synthese des Polymeren 7 61

3. Synthese von 4 (5)-Chlormethylimidazol-hydrochlorid 62

4. Synthese des Polymeren 8 63

5. Hydrolytische Aktivität des Polymeren 8 gegenüber p-Nitrophenylacetat und Vergleich mit monomerem Imidazol 64

III. Trifunktionelles Polyethyleniminderivat 65

1. Synthese des Polymeren 9 65

2. Synthese des Polymeren 10 66

C. Polyvinylaminderivate 67

I. Synthese der Matrix 67

II. Polyvinylaminderivate mit zwei funktionellen Gruppen 69

1. Synthese der Polymeren 11 und 12 69

2. Hydrolytische Aktivität der Polymeren 11 und 12 gegenüber p-Nitrophenylacetat 71

III. Polyvinylaminderivate mit drei funktionellen Gruppen 73

1. Synthese des Polymeren 13 73

2. Gehaltsbestimmung der SH-Gruppen 73

3. Bestimmung der Gleichgewichtskonstante des Polymeren 13 73

Seite

D. Mizellderivate 74

1. Synthese des Kinetikzwischenproduktes 3 74
2. Bestimmung der Gleichgewichtskonstante der Acetyl-Thiophenol/Imidazolmizelle 75
3. Variation der Synthese von N-Stearyl-N, N-dimethyl-N-imidazolyl-(4)-methylammoniumchlorid (2) 76
4. Kinetikmessungen mit Mizellderivaten 77

Literaturverzeichnis 81

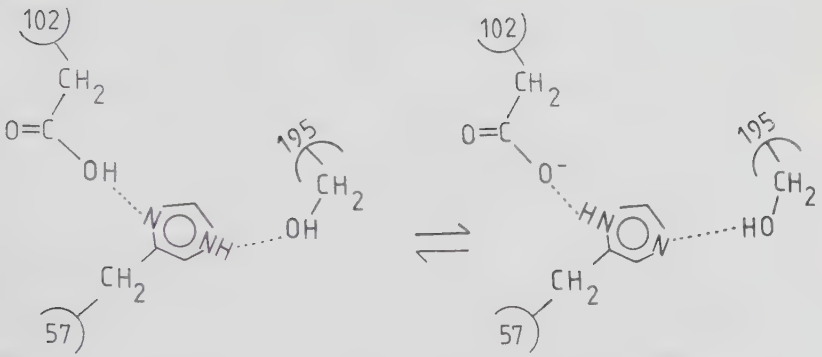
THEORETISCHER TEIL

A. Einleitung und Problemstellung

I. Wirkungsweise einer natürlichen Hydrolase am Beispiel des Chymotrypsins

Die hohe katalytische Potenz eines Enzyms wird von der Natur durch das Zusammenspiel mehrerer funktioneller Gruppen erreicht, die einzeln betrachtet keine oder nur sehr geringe Wirkung aufweisen. Es soll deshalb eingangs der Ablauf einer enzymatischen Reaktion geschildert werden, bevor auf bereits unternommene Versuche zur Synthese künstlicher Enzyme eingegangen wird.

Der Katalysemechanismus des Chymotrypsins, eines Pankreasenzyms, das zur Gruppe der Serin Proteasen gehört, ist sehr eingehend untersucht worden[1)]. Als funktionelle Gruppen sind im aktiven Zentrum dieses Enzyms die OH-Gruppe des Serins 195, die Carboxylfunktion der Asparaginsäure 102 und der Imidazolkern des Histidins 57 erkannt worden. Alle diese Gruppen verfügen über besondere Eigenschaften, die sie für eine kooperative Katalyse geeignet erscheinen lassen. Die Schlüsselposition in diesem hochaktiven System nimmt der ungewöhnlich gut polarisierbare Imidazolring ein. Oberhalb pH 7, dem Wirkbereich der Protease, ist das Proton des Imidazolstickstoffs mit der dissoziierten Carboxylgruppe der benachbarten Asparaginsäure über eine Wasserstoffbrücke verknüpft. In dem so polarisierten Imidazolring trägt das zweite N-Atom einen Überschuß an negativer Ladung. Dieser Stickstoff ist jetzt verstärkt bereit, eine H-Brücke zur nahen OH-Gruppe des Serins auszubilden.



Durch dieses charge-relay System erhält die Serin OH-Gruppe eine größere nucleophile Reaktivität, als einer Hydroxylgruppe sonst zukäme. Dicht beim aktiven Serinrest befindet sich eine tiefe Tasche in der Peptidstruktur des Enzyms. Hier wird das Substrat durch zahlreiche hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrückenbindungen in die richtige Position zu den nucleophilen Gruppen des aktiven Zentrums gebracht. Der Serinrest nimmt durch Rotation um die C-C-Einfachbindung Kontakt mit dem positivierten Kohlenstoff der Ester- oder Amidstruktur des Substrates auf. Aus der Annäherung entwickelt sich eine Bindung, und das Substrat geht in eine tetraedrische Konformation über. Gleichzeitig wird das Proton vom Serin durch das Histidin auf die Abgangsgruppe übertragen. Nachdem dieser Protonentransfer stattgefunden hat, wird die Abgangsgruppe ausgestoßen. Es ist ein Serinester entstanden. Das acylierte Enzym wird anschließend durch ein Wassermolekül verseift, das wiederum durch Wasserstoffbrückenbindung zum Imidazol aktiviert wurde. Der Desacylierungsschritt verläuft in gleicher Weise wie die Substratspaltung über ein tetraedrisches Additionsprodukt. Durch Ausstoß der Abgangsgruppe wird das Enzym regeneriert.

Dieses kooperative System ermöglicht einen Protonentransfer bei den verschiedenen Schritten der Reaktion. Der Substratbindungsmechanismus fixiert das Molekül so zu den reaktiven Gruppen, daß nur eine Drehung um eine Einfachbindung nötig ist, um die Reaktion einzuleiten. Durch diese präzise

Orientierung des Substrates wird die Aktivierungsenergie bedeutend herabgesetzt. Alle diese Prozesse machen eine Nachahmung durch Enzymmodelle äußerst schwierig.

II. Bisherige Versuche zur Synthese künstlicher Enzyme

Es hat nicht an Versuchen gefehlt, die katalytisch wirksamen Gruppen im aktiven Zentrum natürlicher Hydrolasen auf einfache Modelle zu übertragen, um so Mosaiksteine zum Verständnis der sehr komplexen enzymatischen Prozesse zu liefern und um eventuell Wege zu finden, diese Strukturen nach zubauen.

So hat die bekannte Tatsache, daß der Imidazolkern Bestandteil des aktiven Zentrums zahlreicher Hydrolasen ist und wie oben dargestellt am katalytischen Prozeß mitwirkt, die Synthese verschiedener Imidazolverbindungen angeregt. Es wurden monomere und besonders polymere Imidazolderivate mit lipophilen Resten oder hydrophobem Polymergerüst zur Substratfixierung hergestellt und als Katalysatoren zur Verseifung labiler Ester wie p-Nitrophenylacetat ("PNPA") eingesetzt [2, 3].

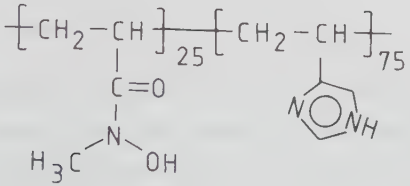
Die Hydrolyse des PNPA wird durch Imidazol zwar katalysiert, die Wirksamkeit ist jedoch bei monomeren Verbindungen gering. Die polymeren Derivate zeigten bessere katalytische Aktivitäten. Durch hydrophobe Wechselwirkungen wurden nahe den Imidazolresten höhere Lokalkonzentrationen an Substrat erreicht. Außerdem können die vielen räumlich eng beieinanderstehenden Imidazoleinheiten durch Wasserstoffbrücken miteinander kooperieren. Es wird auch hier eine Erhöhung der Nucleophilie des tertiären Imidazolstickstoffs durch Interaktion mit einer benachbarten Imidazolmolekel erreicht.

In der nichtenzymatischem Reaktion wird die Verseifung des p-Nitrophenylacetats und ähnlich aktivierter Ester durch einen nucleophilen Katalysemechanismus des Imidazols beschleunigt. Als Zwischenprodukt entsteht Acetyl- bzw. Acylimidazol. Die Hydrolyse dieses Intermediärproduktes durch Wasser

stellt den langsamen Schritt der Reaktionsfolge dar. Dies wird durch die Tatsache deutlich, daß Acylimidazol sich in der Lösung anhäuft.

Voraussetzung für die katalytische Wirkung des Imidazols ist jedoch ein Substrat mit guter Abgangsgruppe, anderenfalls läge das Gleichgewicht auf seiten der Ausgangsstoffe. So werden Ester von aliphatischen Alkoholen vom Imidazol extrem langsam oder gar nicht angegriffen [4].

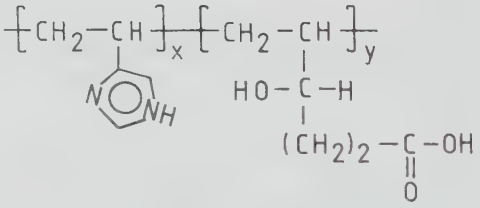
Diese Tatsache und der Katalysemechanismus des Chymotrypsins ist ein wichtiger Hinweis dafür, daß mehrere Gruppen am Enzymmodell besser wirksame Hydrolasen liefern sollten. Vor allem dürfte dies der Fall sein, wenn man potentere Nucleophile als Imidazol verwendet. Einen Beweis für diese Hypothese liefert eine Arbeit von Kunitake und Okahata [5]. Synthetisiert wurde ein bifunktionelles Polymeres, bestehend aus N-Methylhydroxamat- und Imidazoleinheiten.



Dieses Copolymere zeigt eine höhere esterolytische Aktivität als die Summe der durch die Einzelkomponenten (Homopolymeres aus Hydroxamat- oder Imidazolresten) erreichten Konstanten. Als nucleophil aktive Species wurde das Hydroxamatanion erkannt. Da aber wegen des hohen pK_a-Wertes der N-Methylhydroxamsäure bei neutralem pH-Wert nur ein Bruchteil als Anion vorliegt (geringe Aktivität des Hydroxamatpolymeren), wird postuliert, daß durch Wasserstoffbrückenbindung zum Imidazol die Elektronendichte am Hydroxamatsauerstoff erhöht wird. Die so aktivierte undissoziierte Hydroxamsäure ist nun in der Lage, p-Nitrophenylacetat nucleophil anzugreifen. Das

Intermediärprodukt N-Methyl- O-Acetylhydroxamat stellt ein labiles Teilchen mit anhydridartiger Struktur dar. Ein möglicher Desacylierungsmechanismus wäre deshalb auch der nucleophile Angriff des Imidazols unter Bildung von Acetylimidazol. Die Abnahme der kinetischen Konstanten in D_2O lassen jedoch die allgemeine Basenkatalyse des Imidazols wahrscheinlicher erscheinen.

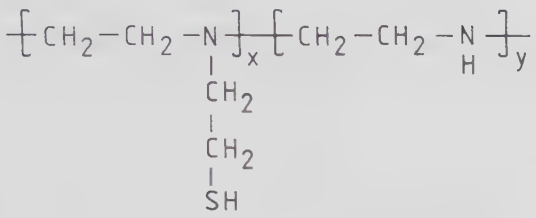
Ebenso schufen Shimidzu et al. [6] durch Copolymerisation von Vinylimidazol und Vinyl-γ-butyrolacton einen Katalysator, der Sequenzen von Imidazol-, Hydroxyl- und Carboxyleinheiten enthielt und ebenfalls die Hydrolyse von PNPA beschleunigt.



Dieses Modellpolymere verfügt über alle katalytisch wirksamen Gruppen des Chymotrypsins. Die alleinige Einfügung einer OH-Gruppe in ein imidazolhaltiges Polymeres führte noch zu keinem kooperativen Effekt; das trifunktionelle Derivat zeigte nur einen Bruchteil der Reaktivität des Chymotrypsins.

Nachdem die katalytische Funktion des Cysteins für eine ganze Anzahl von Enzymen erkannt worden war, wurden Versuche unternommen, die relativ hohe Reaktivität einfacher Thiole zur Darstellung wirkungsvoller Enzymmodelle nutzbar zu machen. Die Nucleophilie des schwächer basischen Thiolanions ist 10-100 mal größer als die von Aminen oder Sauerstoffanionen vergleichbaren pK-Wertes. Diese ausgezeichnete Gleichgewichtskonstante zur Bildung der tetraedrischen Zwischenstruktur verdeutlicht, daß Enzyme, die Thiolgruppen im aktiven Zentrum besitzen, wesentlich wirkungsvollere Katalysatoren darstellen als Enzyme mit Sauerstoffnucleophilen.

Diese Tatsache versuchten Klotz und Birk [7] auszunutzen. Es wurde ein SH-haltiges Polyethyleniminderivat synthetisiert.



Dieses Polymere zeigte eine sehr hohe hydrolytische Aktivität gegenüber PNPA. Hierzu muß gesagt werden, daß von der üblichen Methode der kinetischen Datenermittlung abgewichen wurde. Man bestimmter die Anfangsschwindigkeit v_0, statt wie üblich k_1, die Geschwindigkeitskonstante 1. Ordnung. Außerdem kann dieses Produkt nicht als Katalysator angesprochen werden, da die im Verlauf der Reaktion mit PNPA acetylierten SH-Gruppen nicht regenerierbar sind.

Die noch ungeklärte Papainkatalyse regte zu weiteren eingehenden Modelluntersuchungen an. Bisher ist lediglich die Beteiligung der SH-Gruppen des Cysteins am Katalysemechanismus dieses Enzyms gesichert. Außerdem wird die kooperative Mitwirkung des Histidins oder der Asparaginsäure, eventuell auch beider Reste diskutiert. F. Schneider et al. [8] untersuchten die hydrolytische Aktivität monomerer Imidazolylmercaptane gegenüber PNPA. Es wurde eine Hydrolysekonstante ermittelt, die bei neutralem pH-Wert über der Summe der für Imidazol- und SH-Gruppe allein gefundenen Werte lag. Da die Katalyse nicht dem Brönstedschen Gesetz gehorcht, wurde sie als kooperative Imidazol-SH-Katalyse formuliert.

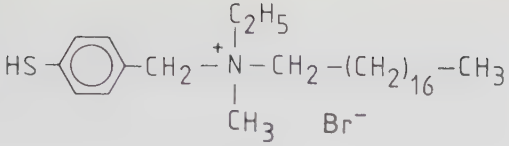
III. Vorarbeiten aus der eigenen Arbeitsgruppe

Der von Klotz und Schneider eingeschlagene Weg war weiterverfolgt worden mit dem Ziel, neue SH-Verbindungen zu synthetisieren, die die esterolytische Wirksamkeit bekannter Mercaptane übertreffen und in Hinblick auf das pH-Optimum vieler Proteasen im neutralen oder schwach sauren pH-Bereich wirksam sein sollten. Durch benachbarte Imidazolreste sollten die SH-Verbindungen regeneriert werden.

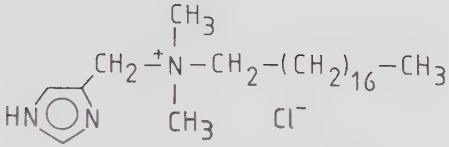
Wie bereits aus früheren Untersuchungen bekannt ist [9], wird die Hydrolyse von PNPA durch SH-Verbindungen nach Art einer nucleophilen Reaktion beschleunigt. Hierbei zeigt der Anstieg der Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung mit steigendem pH-Wert an, daß das Thiolatanion die eigentlich aktive Spezies darstellt. Da die kinetischen Messungen im neutralen pH-Bereich ausgeführt werden sollten, bot sich das Thiophenol als Thiol mit einem pK-Wert um 6 als Schwefelkomponente an. Obwohl die nucleophile Reaktivität einfacher SH-Verbindungen mit sinkendem pK-Wert abnimmt, wird diese Tatsache doch durch die höhere Konzentration an S^- um den Faktor 100 überspielt. Der entstehende Acetylthiolester wird vom Wasser extrem langsam hydrolysiert, weil die elektrophile Aktivität der Carbonylgruppe gegenüber der Carbonylgruppierung von Sauerstoffestern mit gleicher Säurekomponente herabgesetzt ist. Da die Elektronegativitäten von Kohlenstoff und Schwefel gleich sind, übt der Schwefel im Gegensatz zum Sauerstoff keine zusätzliche Positivierung durch induktiven Effekt aus.

Es war daher versucht worden, die Verseifung des Thiolesters mit Imidazol durchzuführen, da das entstehende Acetylimidazol im wäßrigen Medium instabil ist und durch Spontanhydrolyse eine Regenerierung des Katalysatorsystems Thiophenol/Imidazol eintreten sollte.

G. Waldheim [10] hatte in seiner Dissertation erstmals einen kooperativen Effekt von Thiophenolat- und Imidazolresten in wäßriger Lösung bei Substratüberschuß durch Verbindung 1 und 2 nachgewiesen.



1



2

Die beiden katalytisch wirksamen Teilchen bilden den Kopf eines kationischen Tensids. Die langkettigen Alkylreste bewirken in Verbindung mit dem ionischen Zentrum den Zusammenschluß der Moleküle zu Mizellarstrukturen. Als Mischmizelle ist so die räumliche Nähe der Schwefel- und Imidazoleinheiten gewährleistet. Außerdem fixieren die langen Alkylketten das Substrat durch hydrophobe Bindung. Die hydrolytische Aktivität gegenüber PNPA von Verbindung 1 und 2 war jeweils einzeln und im Gemisch beider Verbindungen untersucht worden. Dabei war die gleiche Konzentration von 1 und 2 wie in den Einzelversuchen eingesetzt worden. Die Gesamtkonzentration an potentiell katalytisch wirksamen Teilchen war damit verdoppelt worden. Die katalytische Konstante der Mischmizellen darf nur mit der Summe der Einzelkonstanten verglichen werden. Als Katalysatorkonzentration war der Gehalt der Mischmizelle an Thiophenolgruppen zugrunde gelegt worden. Als Modellsubstrat wurde p-Nitrophenylacetat verwendet, dessen Spaltprodukt p-Nitrophenol bei 400 nm photometrisch problemlos nachgewiesen werden konnte.

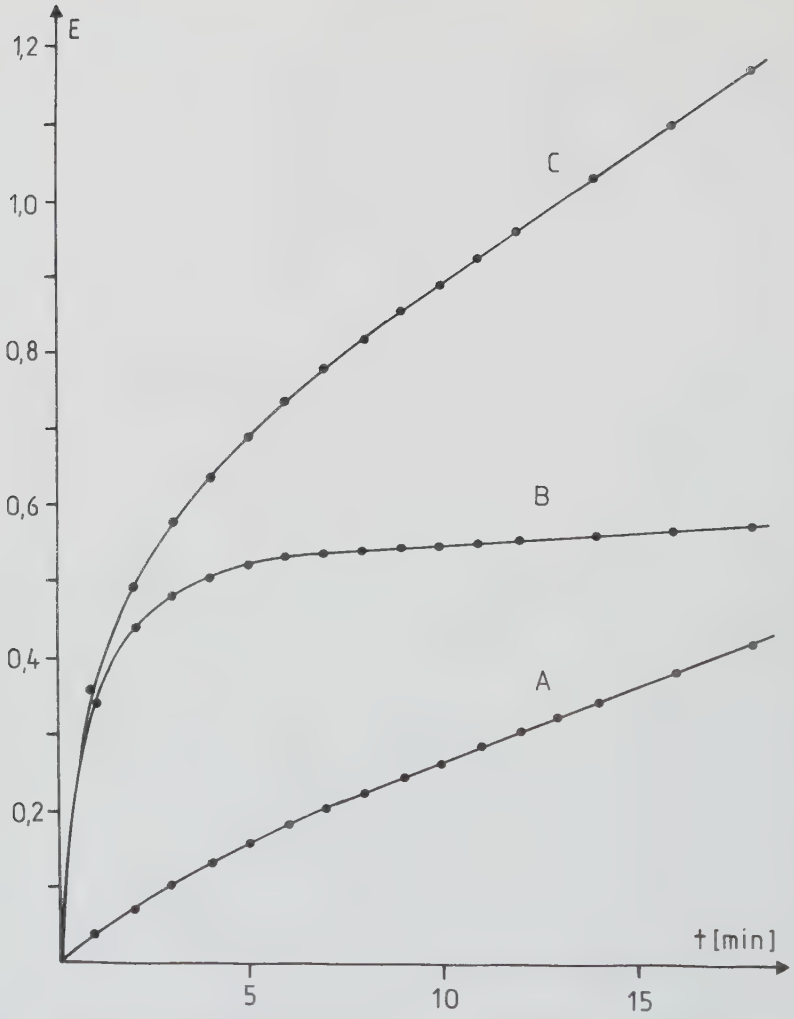


Abb. 1: Extinktion des aus PNPA freigesetzten p-Nitrophenols als Funktion der Zeit (pH 7,2; 25° C)

Kurve A : Verbindung 2 $6,6 \cdot 10^{-5}$ M

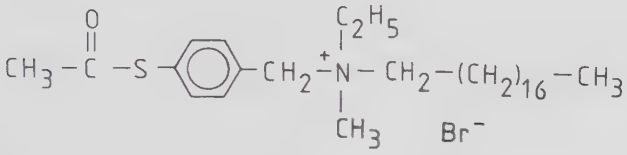
Kurve B : Verbindung 1 $7 \cdot 10^{-5}$ M

Kurve C : Kombination von 1 und 2

Cetyltrimethylammoniumbromid $3,3 \cdot 10^{-5}$ M

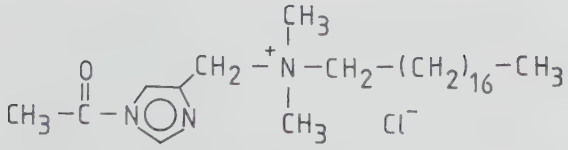
PNPA $1,5 \cdot 10^{-3}$

In Gegenwart des Thiophenolderivates 1 wird zunächst eine rasche Freisetzung von p-Nitrophenol beobachtet (steiler Anstieg "burst" der Kurve B). Nach etwa 8 Minuten ist 1 unter Bildung des Acetylderivates 3 verbraucht.



3

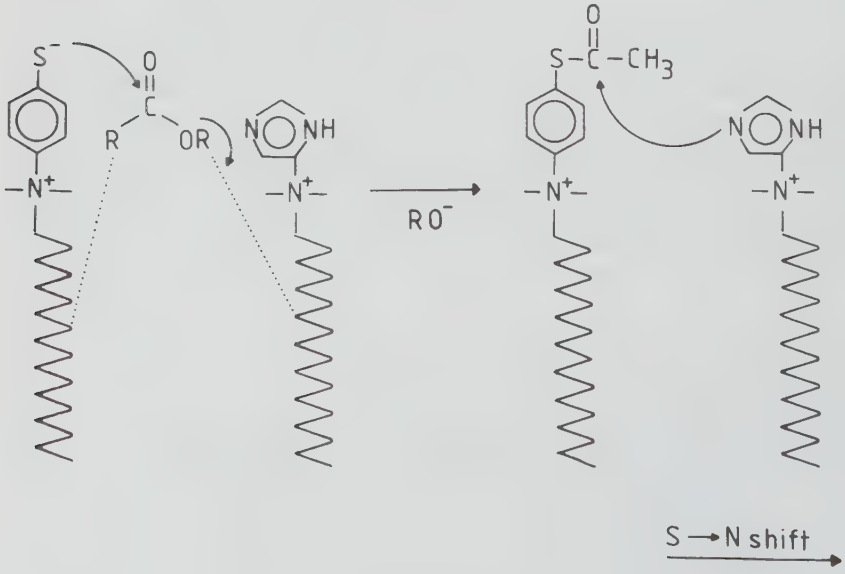
Die Kurve verläuft im beobachteten Zeitraum von 20 Minuten praktisch als Parallele zur x-Achse. Der Schnittpunkt des linearen Kurvenastes mit der Ordinate liefert die Konzentration der Verbindung 3. Verbindung 1 liegt also fast quantitativ in Form von 3 vor. Die Spontanhydrolyse ist extrem gering. Kurve A stellt die entsprechende Kinetik der Esterhydrolyse durch das Imidazolderivat 2 dar. Nach flachem "burst"-Bereich nimmt die Extinktion pro Zeiteinheit linear zu ("steady-state"). Es findet eine stete Freisetzung des p-Nitrophenols als Hydrolyseprodukt statt. Die Konzentration an Verbindung 4 ist gering, das Ordinatenintercept klein. Verbindung 4 wird vom Wasser zu 2 und Essigsäure verseift.

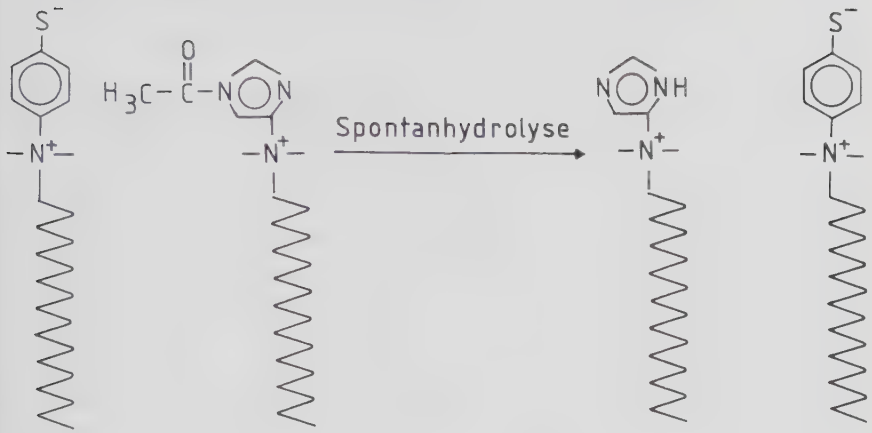


4

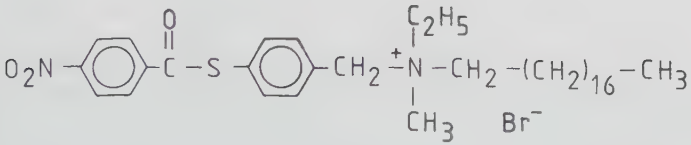
Kombination der Verbindung 1 und 2 zur Mischmizelle ergibt die Kinetik der Kurve C. Nach steilem "burst"-Bereich, der wie in Kurve B durch rasche Reaktion von 1→3 bedingt ist, verläuft die steady-state-Gerade mit etwa der doppelten Steigung wie im linearen Bereich der Kurve A. Dieser überadditive Effekt deutet auf eine Kooperationsfähigkeit des Systems Thiophenolat-/Imidazolrest/lipophile Gruppe hin.

Es war folgender Mechanismus postuliert worden: Das S^--Anion greift auf Grund seiner hohen nucleophilen Potenz die Carbonylgruppe des Substates an und geht in ein S-Acylderivat über. Voraussetzung für diesen Prozeß ist die räumliche Nähe der langkettigen Alkylgruppen zur Substratfixierung. Benachbarte Imidazolreste übernehmen die Acylgruppe und setzen das Thiophenolatanion wieder frei. Durch Spontanhydrolyse des N-Acylimidazols wird das Enzymmodell regeneriert.





Zur Untermauerung dieser Hypothese waren mit Verbindung 5, einer kristallinen Vorstufe von 1, und Verbindung 2 Desacylierungskonstanten bestimmt worden.



5

Bei Zugabe des Imidazolderivates 2 zur wäßrigen Lösung von 5 sollte eine rasche Abspaltung des p-Nitrobenzoylrestes erfolgen. Die Verseifungsgeschwindigkeit müßte sogar die des Acetylderivates übertreffen, da der p-Nitrobenzoylthiophenolester auf Grund der Hammett-Beziehung leichter hydrolysierbar ist als der Thiolester der Essigsäure. Eine UV-spektroskopische Untersuchung dieser Reaktion war infolge mangelnder Differenzierung der Spektren der Reaktionspartner und Hydrolyseprodukte nicht möglich. G. Waldheim hatte deshalb die Kinetikmessung in Gegenwart von Ellman's Reagenz , 5, 5' -Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure) , ("DTNB"), durchgeführt.

DTNB reagiert mit SH-Gruppen zum unsymmetrischen Disulfid und dem orangefarbenen Spaltprodukt, dem Anion der 2-Nitro-5-mercaptobenzoesäure, das bei 412 nm spektralphotometrisch nachgewiesen werden kann.

Die gefundenen Konstanten lagen hoch und die Messungen waren als Beweis für eine rasche Acylübertragung im Mizellarsystem gewertet worden.

IV. Ziel der vorliegenden Arbeit

Die überadditiv schnelle Hydrolysekinetik des p-Nitrophenylacetates durch die Mischmizelle aus Thiophenol- und Imidazoleinheiten und die hohe Desacylierungskonstante bei Spaltung des Thiophenolesters unter dem Einfluß der Imidazolkomponente bilden das Fundament für die Fortsetzung dieses Arbeitsgebietes.

Diese Arbeit befaßt sich mit dem Versuch, die im Mizellarsystem gewonnenen Erkenntnisse auf Polymere zu übertragen, da nur polymer gebundene katalytisch aktive Teilchen eine sinnvolle Anwendung als Arzneistoff ermöglichen würden. Solche künstlichen Hydrolysen wären dann anstelle von Papain oder Pepsin einsetzbar, ohne den Nachteil natürlicher Enzyme wie leichte Denaturierbarkeit zu besitzen. Ferner könnten solche Katalysatoren zur schonenden Hydrolyse von Estern und Amiden bei neutralem pH in der präparativen Chemie Anwendung finden. In Form vernetzter Polymere würden sie dank ihrer Unlöslichkeit eine einfache Abtrennung durch Filtration ermöglichen.

B. Polymere mit katalytisch wirksamen funktionellen Gruppen

I. Theoretische Grundlagen zur Berechnung der Geschwindigkeitskonstanten

Zur Beurteilung der hydrolytischen Aktivität nicht regenerierbarer Katalysatoren wurden die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 herangezogen. Um einen glatten Reaktionsablauf nach dem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung zu gewährleisten, wurde die zu prüfende Verbindung in 10fachem Überschuß zum Substrat eingesetzt. k_1 wird durch folgende Gleichung beschrieben:

$$\ln \frac{S}{S_0} = 2,303 \cdot \log \frac{S}{S_0} = -k_1 t \qquad \text{(Gleichung 1)}$$

S_0 stellt die durch Extrapolation ermittelte Substratkonzentration zur Zeit t_o dar, S gibt die Substratkonzentration zur Zeit t an.

Die graphische Darstellung von log S gegen die Zeit ergibt eine Gerade, die durch die Gleichung 2 beschrieben werden kann.

$$\log S = -k' t + \log S_0 \qquad \text{(Gleichung 2)}$$

k_1 läßt sich, wie durch Umformung und Gleichsetzung beider Gleichungen ersichtlich ist, durch Multiplikation des Steigerungsfaktors k' mit 2,303 berechnen.

k_2, oft auch als k_{kat} bezeichnet, ist ein Maß für die katalytische Potenz eines Teilchens. k_2 ergibt sich aus k_1/c. c ist die Konzentration an monomerer Substanz bzw. polymer gebundener reaktiver Gruppe.

Die Umsetzung regenerationsfähiger Systeme wurde in Gegenwart eines 20-fachen Substratüberschusses durchgeführt. Die Kinetik läuft in zwei voneinander trennbaren Phasen ab, von denen die erste durch eine schnelle exponentielle, die zweite durch eine langsame linear verlaufende Substratspaltung gekennzeichnet ist. Die zweiphasige Reaktionsfolge wird durch folgende Gleichung ausgedrückt.

$$E + S \rightleftarrows ES \begin{cases} \nearrow ES' \rightarrow E + P_2 \\ \searrow +P_1 \end{cases} \qquad \text{(Gleichung 3)}$$

E = Katalysatorsystem, S = Substrat, ES' = acylierter Katalysator
P_1 = p-Nitrophenol, P_2 = Essigsäure

Die Anfangsphase wird durch die Bildung des Katalysator-Substratkomplexes geprägt; es erfolgt die rasche Acylierung des Katalysators unter Freisetzung von p-Nitrophenol. Diese Reaktion verläuft nach dem Geschwindigkeitsgesetz 1. Ordnung. Die anschließende Teilreaktion ist durch die langsamer verlaufende Desacylierung des Katalysators gekennzeichnet und ist geschwindigkeitsbestimmend für den gesamten Reaktionsablauf. Dieser Abschnitt mit konstantem Substratumsatz pro Zeiteinheit entspricht einer Reaktionsgeschwindigkeit 0. Ordnung. Aus der Steigung des linearen Kurvenabschnittes läßt sich die Freisetzungsrate v an p-Nitrophenol pro Minute ermitteln. Bei Division dieser Größe durch die Konzentration an eingesetztem Katalysator wird der Wert WZ berechnet. WZ ist mit der in der Enzymkinetik gebräuchlichen Wechselzahl vergleichbar. Durch die Größe wird ein kooperativ wirkendes System charakterisiert.

II. Synthese, Charakterisierung und Prüfung der potentiellen katalytischen Wirkung der Polymeren

1. Polyethyleniminderivate

Es mußten klar wasserlösliche Polymere synthetisiert werden, da nur unter dieser Voraussetzung eine exakte spektralphotometrische Kinetikmessung gewährleistet war.

In Anlehnung an Arbeiten von Klotz wurde Polyethylenimin ("PEI") als polymeres Grundgerüst verwendet. PEI ist ein hochverzweigtes, wasserlösliches Polymer; der Gehalt an primären Aminogruppen beträgt 25 %; 50 % sind

sekundär und 25 % tertiär. Polyethylenimin mit einem Molekulargewicht von 60.000 ("PEI 600") ist handelsüblich und wurde für die polymeranalogen Umsetzungen verwendet.

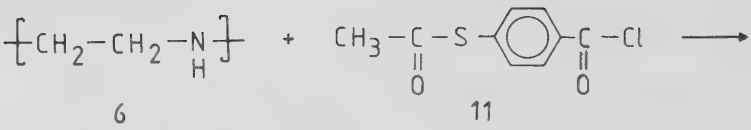
Klotz et al. [7] setzten Polyethylenimin mit Ethylensulfid zu einem SH-haltigen Makromolekül um, das esterolytische Aktivität besaß. 2,5 % der Stickstoffe des PEI wurden mit CH_2-CH_2-SH-Gruppen besetzt. Durch Substitution weiterer 10 % der N Atome mit Lauroylresten konnte eine weitere Steigerung der hydrolytischen Potenz des Polymeren erreicht werden. Es muß nochmals darauf hingewiesen werden, daß dieses System keine enzymatischen Eigenschaften aufweist. Das Polymer verliert bei Substratüberschuß seine Effektivität, wenn alle SH- und primären NH_2-Gruppen acyliert sind.

a) Thiophenolhaltige Polyethyleniminderivate

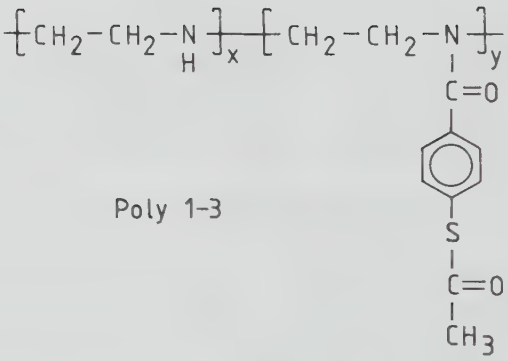
Zur Überprüfung der Tatsache, ob durch Substitution mit Thiophenol ein ähnlich effektives Derivat zu erhalten war, wurde eine Serie Polyethylenimine mit aromatischen SH-Gruppen hergestellt.

Synthese der Polymeren 1 - 3

Zur Darstellung der schwefelhaltigen Polymeren wurde Polyethylenimin mit S-Acetyl-p-mercaptobenzoesäurechlorid umgesetzt. Der Substitutionsgrad sollte 10 %, 20 % und 50 %, bezogen auf alle N-Atome, betragen (Poly 1-3).



6 11

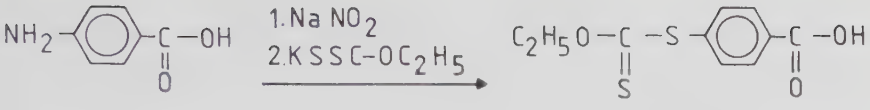


Poly 1-3

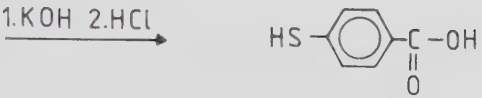
Die Abtrennung der Polymeren von monomeren Bestandteilen wurde durch Gelfiltration an Sephadex LH 20 erreicht.

Die Polyethyleniminderivate Poly 1-3 besaßen unterschiedliches Löslichkeitsverhalten. Nur das Polymere 1 war klar in Wasser und Methanol löslich und konnte zu kinetischen Untersuchungen eingesetzt werden.

Die Synthese der Thiophenolkomponente erfolgte nach einer Vorschrift von P. F. Wiley [11]. Ausgangsverbindung war p-Aminobenzoesäure. Die aromatische Aminogruppe wurde durch Diazotierung, Umsetzung des Diazoniumsalzes mit Kaliumethylxanthogenat und anschließende Verseifung des Xanthogenates in wäßriger Kalilauge gegen eine SH-Gruppe ausgetauscht.

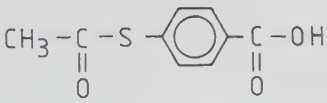


7 8



9

Da nicht unter Schutzgasatmosphäre gearbeitet wurde, lag Produkt 9 teilweise als 4,4'-Dithiobisbenzoesäure vor. Das Disulfid wurde mit Zn/Eisessig reduziert und mit Acetanhydrid sofort in Verbindung 10 überführt.



10

Durch die Acetylierung wurde die SH-Gruppe in Hinblick auf die nachfolgende Umsetzung an der Carbonylgruppe ausreichend geschützt. Verbindung 10 wurde mit Thionylchlorid in das S-Acetyl-4-mercaptobenzoesäurechlorid 11 überführt.

Charakterisierung des Polymeren 1

Der Aufbau der Elementarzelle wurde mit Hilfe der Elementaranalyse ermittelt. Aus dem Ergebnis der Elementaranalyse für Poly 1 (N 11,28 %, S 4,81 %) folgt: 100,0 gPolymer enthält 4,81 g S, der an 2,1 g Stickstoff als Säureamid gebunden vorliegt. 9,18 g N liegen frei vor. 100,0g Polymer enthält also 4,371 mal soviel freien wie gebundenen Stickstoff. Das Molekulargewicht der Elementarzelle beträgt 409.

100,0 g Polymer enthält statt 7,82 nur 4,81 % Schwefel = 61,5 %. 38,5 % stellen eine Verunreinigung dar, die weder S- noch N-haltig ist. Nach Aussage des NMR Spektrums handelt es sich um Methanol, das als Elutionsmittel bei der Sephadexfiltration verwendet wurde und trotz mehrstündigen Trocknens am Hochvakuum vom Polymeren hartnäckig festgehalten wird.

Als Maß für den Gehalt an katalytisch wirksamen Teilchen dient die Anzahl Val S pro Liter.

Schutzgruppenabspaltung vom Polymeren 1

Während der alkalischen Abspaltung der Schutzgruppe unter Argonatmosphäre flockte das Polymer nach Zugabe von NaOH aus. Es konnte erst nach Neutralisation mit HCl wieder in Lösung gebracht werden. Das Polymer zeigte ein den Peptiden ähnliches Verhalten und fiel bei stark alkalischem, sowie stark saurem pH aus der Lösung aus. Schon dieser Umstand ließ eine quantitative Verseifung des Thiolesters nicht mehr erwarten, da die Natronlauge nur an der Oberfläche der Polymerflöckchen wirksam werden konnte.

Ein Ausweichen auf eine andere Schutzgruppe bot sich jedoch auch nicht an. Die bekannten SH-Schutzgruppen lassen sich nur unter Bedingungen entfernen, die die Eigenschaften des Makromoleküls irreversibel verändern würden. So kann beispielsweise die Tritylgruppe nur mit Metallsalzen abgespalten werden. Das bei der Aufarbeitung entstehende feste Metallsulfid läßt sich nicht vom Polymeren abtrennen. Ebenfalls kommen Schutzgruppen, die abhydriert werden müssen, nicht in Frage, weil ein enger Kontakt zwischen den funktionellen Polymergruppen und dem Festkörperkatalysator nicht gegeben ist.

Es wurde eine quantitative Bestimmung der freigesetzten SH-Gruppen vorgenommen. Als Nachweisreagenz diente Ellman's Reagenz, die 5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)-("DTNB"), die durch freie SH-Gruppen zur 2-Nitro-5-mercaptobenzoesäure reduziert wird [12].

Es konnten auch nach einstündiger Verseifungsdauer nur ein Drittel freie SH-Gruppen nachgewiesen werden. Um die Frage zu klären, ob freigesetzte Thiophenolgruppen durch Luftsauerstoff zum Disulfid aufoxydiert wurden, bestimmte man den Gehalt an S-S-Gruppen nach der von Zahler und Cleland beschriebenen Methode [13]. Als Reduktionsmittel diente Dithioerythrit ("DTE"). Es wurden keine weiteren, ursprünglich oxydierten SH-Gruppen gefunden. Vermutlich liegen die restlichen Thiolestergruppen durch das Polymergerüst weitgehend abgeschirmt vor und sind einer Verseifungsmöglichkeit entzogen.

Esterolytische Wirkung des Polymeren 1

Zur Beurteilung der hydrolytischen Aktivität wurden die Geschwindigkeitskonstanten k_1 und k_2 herangezogen. Die Berechnung der Konstanten wurde auf die mit DTNB nachweisbaren SH-Gruppen bezogen.

Das Polymere 1 zeigte nur eine geringe Effektivität gegenüber p-Nitrophenylacetat. Die ermittelte k_2 Konstante betrug nur $\frac{1}{10}$ des von G. Waldheim [10] beschriebenen wirkungsvollsten alkylierten Thiophenolderivates.

b) Polyethyleniminderivate mit Alkylgruppen und Imidazol

Um verbesserte Substrat Katalysatorwechselwirkungen zu erreichen, wurden nun Polyethyleniminderivate mit langkettigen Alkylgruppen synthetisiert, die dann mit den entsprechenden nucleophilen Substituenten versehen werden sollten.

Der Versuch, Polyethylenimin mit Stearylbromid umzusetzen, mißlang. Durch Langzeitreaktion bei Zimmertemperatur, ebenso bei erhöhter Temperatur und unter KJ-Katalyse, war keine Substitution zu erreichen. Erst die Verwendung von Stearyljodid führte zu der gewünschten Umsetzung. Es wurde ein Derivat mit 10 % C_{18}-Ketten, bezogen auf Ethylenimineinheiten, hergestellt (Poly 4). Die Verbindung war in Wasser unlöslich und daher zur Messung nicht geeignet. Ursache dafür war die zu große Gesamtlipophilie der Reste, die mit der Anzahl der Kohlenstoffe der Seitenkette parallel geht.

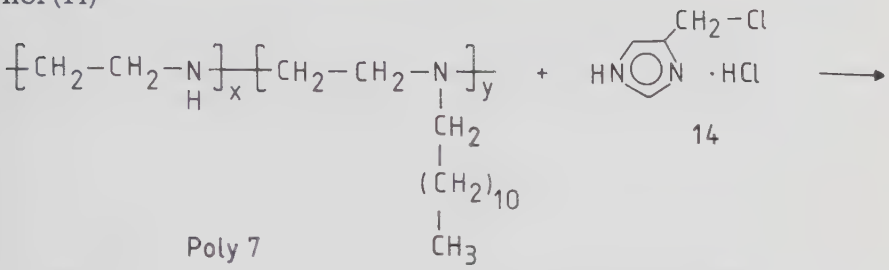
Es wurden weitere Polymere hergestellt, die gegenüber Poly 4 weniger lipophil waren. Einmal wurde versucht, den Besetzungsgrad zu reduzieren; Poly 5 sollte mit 5 %, Poly 6 mit 2,5 % Stearylresten besetzt sein. Dadurch wurde eine stufenweise Verbesserung der Löslichkeit erreicht, jedoch war auch eine Lösung von Poly 6 in Wasser milchig getrübt.

Daher mußte die Substitution mit einem Alkyljodid kürzerer Kettenlänge wie Dodecyljodid durchgeführt werden. Poly 7 sollte laut Synthese einen Alkylierungsgrad von 5 % besitzen. Nach Gelfiltration über Sephadex wurde an Hand des NMR-Spektrums durch Vergleich der Integrale der Protonensignale ein Besetzungsgrad von 3,5 % errechnet. Das Derivat verfügte über eine gute Wasserlöslichkeit. Das Polymere wurde mit Imidazoleinheiten substituiert.

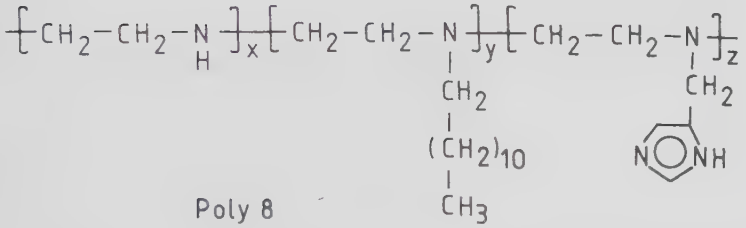
Wie einleitend erwähnt, stellt diese von Klotz et. al. synthetisierte Verbindung ein Beispiel für ein wirksames Enzymmodell dar, das häufig zitiert worden ist. Da wie oben erwähnt eine sonst nicht übliche Auswertung der Meßergebnisse vorgenommen wurde, mußte ein Analoges erneut hergestellt und die Messungen unter den in dieser Arbeit gewählten Versuchsbedingungen wiederholt werden. Ferner sollte die Wasserlöslichkeit des Polymeren geprüft und abgeschätzt werden, bis zu welchem Grad eine Substitution mit dem lipophilen Thiophenol möglich ist.

Synthese des Polymeren 8

Die Darstellung erfolgte durch Umsatz des Poly 7 mit Chlormethylimidazol-HCl (14)



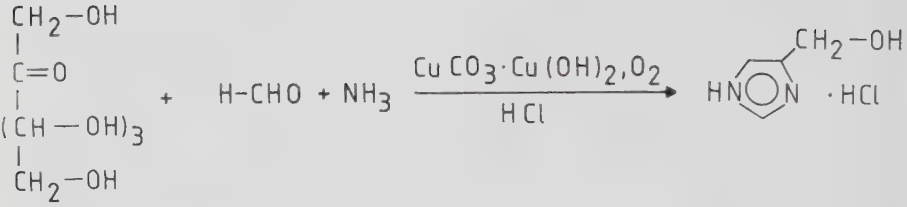
Poly 7 14



Poly 8

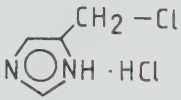
Die Freisetzung der polymergebundenen Imidazol-Base wurde durch Ionenaustauschchromatographie vorgenommen, die Abtrennung der Monomeren durch Gelfiltration über Sephadex (Poly 8).

Chlormethylimidazol-HCl (14) wurde bis zur Stufe des 4(5)-Hydroxymethylimidazol-hydrochlorids nach der von Weidenhagen [14] et al. erstmals beschriebenen und später von Darby und Totter [15] überarbeiteten Vorschrift hergestellt. Ausgangsstoffe sind Fructose, Formaldehyd und Ammoniak, die in Gegenwart basischen Kupfercarbonats zur Reaktion gebracht werden.



12 13

Durch Umsetzung der Verbindung 13 mit Thionylchlorid konnte das halogenierte Derivat 14 gewonnen werden[16].



14

Charakterisierung des Polymeren 8

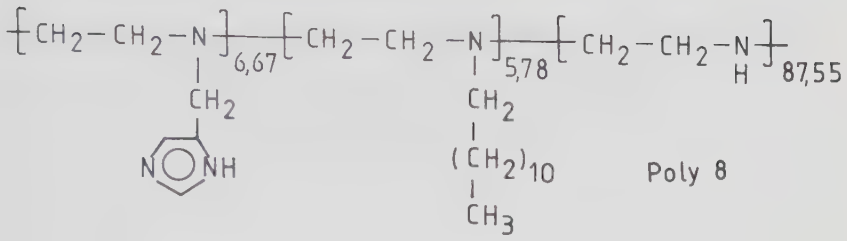
Die Polymerzusammensetzung wurde durch das NMR-Spektrum ermittelt:

2 Imidazolprotonen	8 ppm, 7,4 ppm	1,5	Einheiten
4 Ethyleniminprotonen	2,8 ppm	45	Einheiten
20 CH_2-Protonen	1,4 ppm	13	Einheiten

$\frac{1,5}{2} : \frac{45}{4} = 1 : 15 \;\hat{=}\; 6,67\,\%$ Imidazol

$\frac{13}{20} : \frac{45}{4} = 1 : 17,3 \;\hat{=}\; 5,78\,\%$ Dodecylreste

Es ergibt sich demnach folgendes Bild:



Poly 8

Die Einwaagen wurden auf Imidazol als katalytisch wirksame Spezies bezogen.

Esterolytische Wirkung des Polymeren 8

Es handelt sich bei diesem Makromolekül um ein Derivat, das in einfacher Form einer enzymatischen Reaktionsfolge Rechnung trägt. Die Katalyse wird mit der Bindung des Substrates eingeleitet, dann erfolgt die Acylierung der nucleophilen Imidazoleinheiten durch das Substrat und schließlich wird durch Verseifung des Acetylimidazols der Katalysator regeneriert. Es findet ein "turnover" statt. Um diese Effekte studieren zu können, wurde die Messung mit Substratüberschuß durchgeführt.

Für das Polymere 8 wurde eine Wechselzahl von $2,4 \cdot 10^{-2}$ min^{-1} gefunden. Zum Vergleich wurde monomeres Imidazol unter den gleichen Reaktionsbedingungen eingesetzt und eine Wechselzahl von $1,76 \cdot 10^{-2}$ min^{-1} ermittelt. Das polymer gebundene Imidazol zeigt also nur einen leicht erhöhten katalytischen Effekt, verglichen mit dem Monomeren. Möglicherweise werden durch das stark verzweigte Polyethylenimingrundgerüst viele hydrolytisch wirksamen Gruppen sterisch abgeschirmt und für das Substrat unzugänglich.

c) Trifunktionelles Polyethyleniminderivat

Die Umsetzung des Polymeren 8 mit S-Acetylmercaptobenzoesäurechlorid (5 % bezogen auf PEI-Einheiten) führte nach üblicher Aufarbeitung zu einem völlig wasserunlöslichen Produkt (Poly 9).

Es wurde postuliert, daß ein S→N-shift der Schwefelschutzgruppe während der Reaktion eingetreten war, die freigesetzten SH-Gruppen durch den Luftsauerstoff zu Disulfiden oxidiert und so eine Vernetzung des Polymeren verursacht hatten.

Die Synthese wurde unter Schutzgasatmosphäre wiederholt. Beim Versuch, den Reaktionsansatz direkt zur Kinetikmessung zu verwenden, fiel das Polymer beim Einspritzen in die Pufferlösung aus. Da die Prüfungen auf freie SH- und Disulfidgruppen ebenfalls an die Wasserlöslichkeit der Probe gebunden sind, konnte nicht entschieden werden, ob die mangelnde Löslichkeit durch einen zu hohen Besetzungsgrad des Polymeren mit lipophilen Gruppen verursacht wurde oder ob die beiden nucleophilen Komponenten in einer in Hinblick auf die katalytische Potenz zwar beabsichtigten Weise miteinander kooperiert hatten.

Zur Klärung der Frage wurde ein Polymer hergestellt, das mit 3,5 % lipophilen Fanggruppen und 2,5 % Thiophenoleinheiten besetzt war (Poly 10). Das Produkt war ebenfalls wasserunlöslich.

Die schlechten Lösungseigenschaften rührten also von der starken Lipophilisierung des Polymeren und dessen hochmolekularer Struktur her.

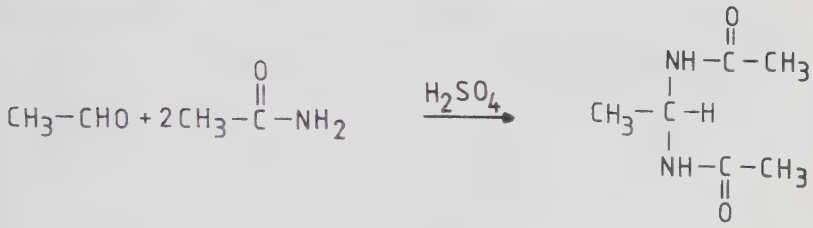
2. Polyvinylaminderivate

Die Hauptschwierigkeit bei der Untersuchung der Polymeren Poly 1-10 war die oft mangelnde Wasserlöslichkeit der Derivate. Es wurde deshalb zu einem linearen polymeren Grundgerüst übergegangen. Als Matrix bot sich das extrem gut wasserlösliche Polyvinylamin an.

a) Synthese der Matrix

Die Synthese des Polymeren wurde nach einer kürzlich veröffentlichten Vorschrift von D. J. Dawson et al. durchgeführt.[17)]

Zur Darstellung des Monomeren N-Vinylacetamid (16) wurde Acetaldehyd mit 2 Äquivalenten Acetamid unter dem katalytischen Einfluß von Schwefelsäure zu 15 kondensiert.

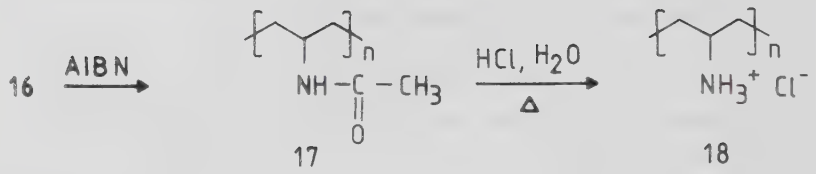


15

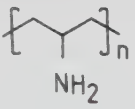
Das entstandene Ethylenbisacetamid (15) wurde durch Pyrolyse in Vinylacetamid (16) überführt.

16

Polyvinylacetamid (17) wurde durch radikalische Polymerisation der Verbindung 16 erhalten. Dabei entsteht ein Makromolekül mit dem Molekulargewicht von etwa 30. 000. Die Abspaltung der Acetylgruppen von 17 zu 18 erfolgte durch Kochen mit Salzsäure.



Durch Ionenaustauschchromatographie wurde die freie Base 19 erhalten, die nun für Substitutionsreaktionen zur Verfügung stand.



19

Das Polymer-NMR-Spektrum wies bei 2 ppm noch einen Acetylpeak auf. Aus den Protonenintegralen wurde ein Gehalt von 20 % nicht verseifter Amidgruppen errechnet.

b) Polyvinylaminderivate mit zwei funktionellen Gruppen

Synthese der Polymeren 11 und 12

Polyvinylamin wurde mit Dodecyljodid in N-Methylpyrrolidon und ohne Aufarbeitungsschritt mit Chlormethylimidazol-HCl umgesetzt. Es wurden auf diese Weise zwei Derivate hergestellt (Poly 11, Poly 12). Beide Polymeren unterschieden sich im Besetzungsgrad mit lipophilen als auch nucleophilen Gruppen.

Charakterisierung des Polymeren 11

Die Berechnung der Elementarzelle erfolgte mit Hilfe des NMR-Spektrums. Da die Protonensignale der Dodecylgruppe und der $-CH_2$-Gruppe des Polymeren übereinander liegen, erfolgte die Gehaltsbestimmung von Imidazol- und Dodecylresten durch Berechnung des Verhältnisses von Imidazol- zu Acetylprotonen, unter der Annahme, daß die Acetylmenge bei der Synthese gleich blieb.

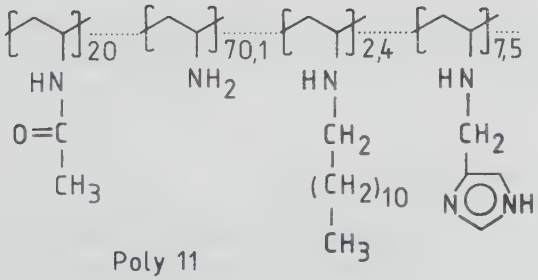
Acetyl an jedem 5. N = 14 Einheiten $\hat{=}$ 4,67/Proton
Imidazol an jedem X. N = 3,5 Einheiten $\hat{=}$ 1,75/Proton

$$\frac{1,75}{4,67} = 0,375 \qquad 0,375 \cdot 0,2 = 0,075$$

0,075 der Stickstoffatome sind mit Imidazolresten besetzt $\hat{=}$ 7,5 %

Das gemeinsame Integral der Dodecyl- und Polymer-CH_2-Gruppe wurde mit der CH_2-Gruppe eines Spektrums des unsubstituierten Polyvinylamins verglichen.

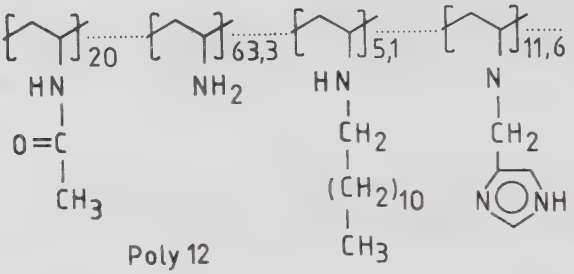
Bei mengenmäßig gleicher Probeneinwaage ergab sich ein Gehalt von 2,4 % an Alkylgruppen.



Poly 11

Charakterisierung des Polymeren 12

Das Polymere 12 war laut NMR-Spektrum mit 11,6 % Imidazoleinheiten und 5,1 % Dodecylgruppen besetzt. Die Auswertung erfolgte wie oben dargestellt.



Poly 12

Für die Einwaagen zur Kinetikbestimmung wurde die Imidazolmenge zugrunde gelegt.

Esterolytische Wirkung der Polymeren 11 und 12

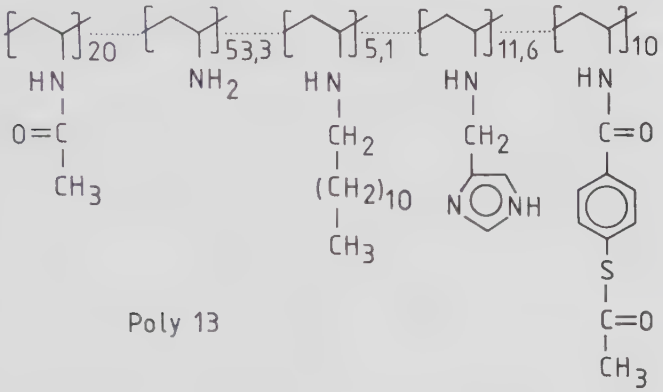
Poly 11 beschleunigte die Hydrolyse von PNPA mit einer WZ von $2,8 \cdot 10^{-2}$ min^{-1}. Dieser Wert liegt in der Größenordnung der von G. Waldheim [10] gefundenen Wechselzahl $2,83 \cdot 10^{-2}$ min^{-1} für Dimethylstearylimidazol-(4)-methylammoniumchlorid. Die ermittelte Wechselzahl für Poly 12 lag bei $3,72 \cdot 10^{-2}$ min^{-1}. Es machten sich hier die verbesserten Substrat-Katalysatorwechselwirkungen durch vermehrte Anzahl von Fanggruppen gegenüber Polymer 11 bemerkbar. Ebenso scheinen die Imidazolringe durch den dichteren Besetzungsgrad im Sinne einer Nucleophilieerhöhung des tertiären Stickstoffs durch die benachbarten Imidazolringe miteinander zu kooperieren.

c) Trifunktonelles Polyvinylaminderivat

Das Polymere 12 wurde als Edukt zur Umsetzung zum trifunktionellen Derivat gewählt. Es besaß die bessere hydrolytische Aktivität und war in N-Methylpyrrolidon löslich. Dieses Lösungsmittel war als einziges zur Umsetzung mit dem Säurechlorid geeignet, da sich die beiden Polymerderivate sonst lediglich in Wasser, Methanol und Ethanol lösten.

Synthese des Polymeren 13

Polymer 12 wurde in dem aprotischen Lösungsmittel N-Methylpyrrolidon unter Schutzgasatmosphäre mit S-Acetylmercaptobenzoesäurechlorid zur Lösung des Polymeren 13 umgesetzt.



Poly 13

Unter der Voraussetzung, daß die Umsetzung quantitativ war, erhielt man einen Besetzungsgrad mit Schwefeleinheiten von 10 %, der dem Substitutionsgrad von 11,6 % Imidazolresten entsprach.

Es sollte, falls es sich um ein effektives Katalysatorsystem handelt, schon während der Substitutionsreaktion eine Schutzgruppenabspaltung durch das Imidazol erfolgt sein.

Die Lösung von 13 wurde als Stammlösung zu den photometrischen Messungen eingesetzt.

Bestimmung der freien SH-Gruppen des Polymeren 13

Die Anzahl freigesetzter SH-Gruppen ist ein Maß für die Imidazolyse des Thiophenolesters. Da zwischen Synthese und Messung ein Zeitraum von über 24 Stunden lag, wurde eine quantitative Abspaltung der Schutzgruppe und ein Extinktionswert von 0,680 erwartet. Statt dessen wurde nach Zugabe von Ellman's Reagenz zu einer Katalysatorprobe und vorgeschriebener

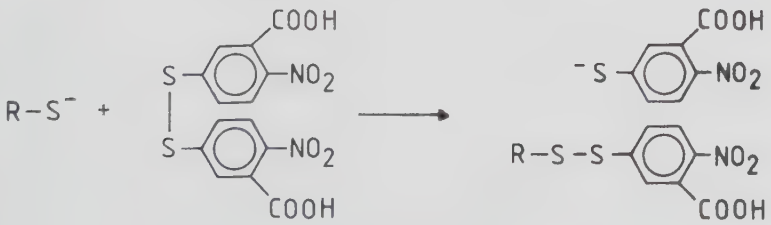
zweiminütiger Wartezeit eine Extinktion von 0, 090 abgelesen. Es war jedoch ein kontinuierlicher Anstieg der Meßwerte zu beobachten. Unter dem Einfluß von DTNB fand also eine Reaktion statt, deren Kinetik photometrisch verfolgt wurde.

C. Begründung des Scheiterns dieser Versuche

Dieses alarmierende Ergebnis würde bedeuten, daß keine Selbstaktivierung eingetreten war. Damit würde die eingangs aufgestellte Forderung nach kooperativer Wechselwirkung zwischen Imidazol und Thiophenol hinfällig. Erst unter dem Einfluß von Ellman's Reagenz setzte eine vermehrte Freisetzung von SH-Gruppen ein.

Dieses Ergebnis muß in folgender Weise interpretiert werden:
Es handelt sich bei der Acetylübertragung von Thiophenol auf das Imidazol um einen reversiblen Prozeß. Das Gleichgewicht des Systems ist zugunsten des Thiophenolesters verschoben.

Durch Zugabe von DTNB wird dieser Gleichgewichtsreaktion eine sehr rasch ablaufende Redoxreaktion nachgeschaltet. Durch diese Störreaktion werden die nur zu einem Bruchteil vorhandenen freien SH-Gruppen ständig in das unsymmetrische Disulfid überführt.



Durch Nachbildung freier SH-Gruppen stellt sich das Gleichgewicht erneut ein.

Bestätigungen für diese Annahme finden sich in der Literatur. Jencks [19] ermittelte eine Gleichgewichtskonstante für das Reaktionspaar Acetylimidazol/Thiophenol von 1000.

$$K = \frac{[IM]\ [RSAc]}{[AcIM]\ [RSH]} \qquad \text{(Gleichung 4)}$$

Allerdings wird durch die Verseifung des Acetylimidazols im wäßrigen Milieu das Gleichgewicht zugunsten der freien SH-Gruppen etwas verschoben. Diese Reaktion ging nicht in die oben genannte Konstante ein. Die Hydrolyse stellt jedoch einen langsamen Prozeß dar.

Für das polymer gebundene Imidazol-Thiophenolsystem wurde eine Gleichgewichtskonstante von 71,4 ermittelt. Es wurde eine SH-Freisetzungskinetik in Gegenwart von DTNB gemessen und die Konzentration an SH zur Zeit t_o ermittelt. Da dieser Wert der Konzentration an Acetylimidazol entspricht, ergibt sein Quadrat den Nenner der Gleichung 4.

D. Wiederholung der Messungen im Mizellarsystem und Diskussion

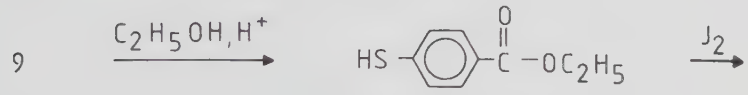
Da dieses Ergebnis von grundlegender Bedeutung für die Fortsetzung der Arbeit war, sollte es am Mizellarsystem überprüft werden. Die von G. Waldheim [10] gefundenen hohen Desacylierungskonstanten der p-Nitrobenzoesäurethiophenolester unter dem Einfluß der Imidazolmizelle wurden in Gegenwart von DTNB bestimmt. Sie stellen daher keine Imidazolysekonstanten des Thiolesters dar, sondern sind als Geschwindigkeitskonstanten der Gleichgewichtseinstellung zu werten.

Dieses fehlerhafte Konzept bei der Durchführung der Messung zwang zur Wiederholung der Versuche unter veränderten Bedingungen.

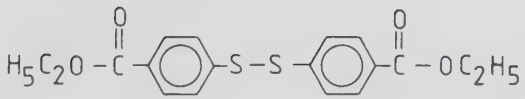
I. Untersuchungen mit dem Zwischenprodukt der p-Nitrophenylacetatkinetik

Synthese des acetylierten Katalysators

Zur Darstellung von N-Ethyl-N-methyl-N-stearyl-4-(p-acetylthio)-benzylammonium-bromid(3) diente als Ausgangsprodukt 4-Mercaptobenzoesäure (9). Verbindung 9 wurde in den Ethylester überführt und nach Oxidation mit Jod als Disulfid 21 durch Umkristallisation gereinigt.

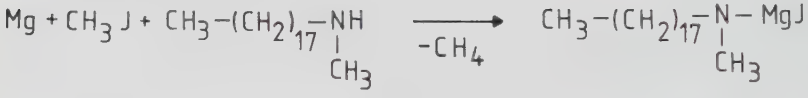


20

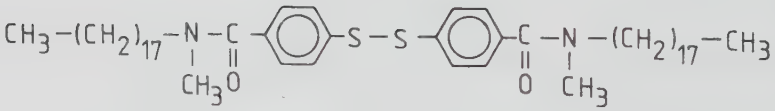


21

Das 4,4'-Diethoxy-carbonyl-diphenyldisulfid 21 wurde nach Bodroux[18] in das substituierte Amid 24 überführt. Hierbei wurde das aus Methylmagnesiumjodid und einem sekundären Amin entstehende Aminmagnesiumjodid 23 in einer Grignard-analogen Reaktion mit dem Dicarbonsäureester 21 zu 24 umgesetzt.

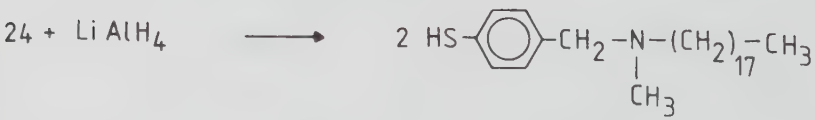


22 23



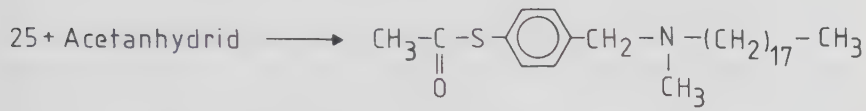
24

Produkt 24 wurde mit Litiumalanat zu 25 reduziert,

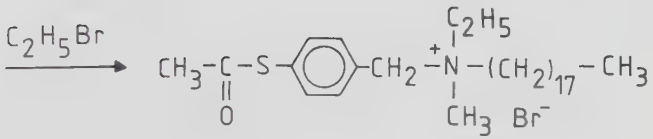


25

dieses sofort mit Acetanhydrid zu 26 acetyliert und mit Ethylbromid zum quartären Endprodukt 3 umgesetzt.



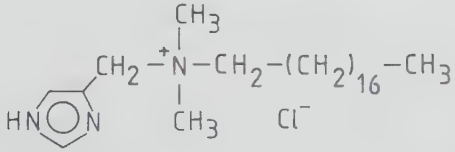
26



3

Versuch der Esterolyse der Verbindung 3 unter dem Einfluß von Verbindung 2

Verbindung 3 stellt das Zwischenprodukt der Hydrolysekinetik von p-Nitrophenylacetat dar. Es sollte nun die Hydrolyse von 3 unter dem Einfluß des Imidazolderivates 2 geprüft werden.



2

Beide Reaktionspartner wurden zusammengefügt und nach verschiedenen Zeiten Proben entnommen, die mit DTNB auf ihren SH-Gehalt untersucht wurden. Die abgelesenen Extinktionswerte, extrapoliert zur Zeit t_o, blieben

stets gleich. Damit konnte gezeigt werden, daß ein kooperativer Effekt, wie er von G. Waldheim postuliert worden war, nicht existierte.

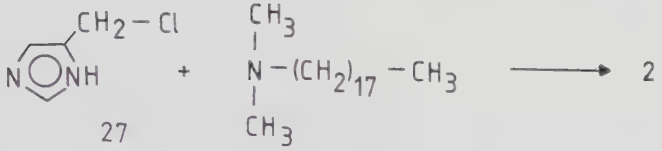
Es wurde eine Gleichgewichtskonstante mit der analytisch reinen Verbindung 2 von 34, 8 errechnet. Der nur halb so hohe Wert, verglichen mit der Konstante für das Polymersystem, läßt sich aus der optimalen räumlichen Nähe der beiden Nucleophile in diesem mizellaren System erklären. Außerdem häufen sich am kationischen Kopf der Mizelle OH-Teilchen an, die für eine schnellere Hydrolyse des acetylierten Imidazolderivates sorgen und so das Gleichgewicht zugunsten der Schwefelesterspaltung verschieben.

II. Messungen mit der analytisch reinen Imidazolmizelle 2

Dieses Ergebnis stand im Widerspruch zu der von G. Waldheim [10] gefundenen Hydrolysegeschwindigkeit des PNPA durch oben genanntes Katalysatorsystem. Verglichen mit den Kinetikkurven der Einzelkomponenten hatte sich für die Mischmizelle ein überadditiver Effekt ergeben.

Das Imidazolderivat stellt einen bereits bekannten Katalysator dar, der von Tagaki [19] erstmals synthetisiert worden war. Da die Darstellungsvorschrift sehr allgemein gehalten war, hatten sich Schwierigkeiten ergeben, die Synthese nachzuvollziehen.

Die Verbindung 2 war durch Quarternisierung des Dimethylstearylamins mit Chlormethylimidazol hergestellt worden. Die von G. Waldheim synthetisierte und zu Messungen eingesetzte Ammoniumbase war mit 40 % Ausgangsamin verunreinigt. Diese erheblichen Mengen konnten die kinetischen Meßergebnisse verfälschen. Es wurde deshalb von G. Waldheim versucht, eine Synthesevariante zu finden, die zu einem reinen Produkt führte.



27 28

Die Base 27 wurde während der Reaktion aus dem Hydrochlorid 14 hergestellt. Amin 28 wurde durch Leukart-Wallach-Reaktion aus Verbindung 22 synthetisiert.

Mit der analytisch reinen Imidazolverbindung wurden die 3 Messungen der PNPA-Esterolyse durch die Thiophenol- und Imidazolkomponente einzeln und in Kombination beider Partner wiederholt. Das Ergebnis führte zu einer Korrektur der zuvor gefundenen Kurvenbilder (Abb. 2).

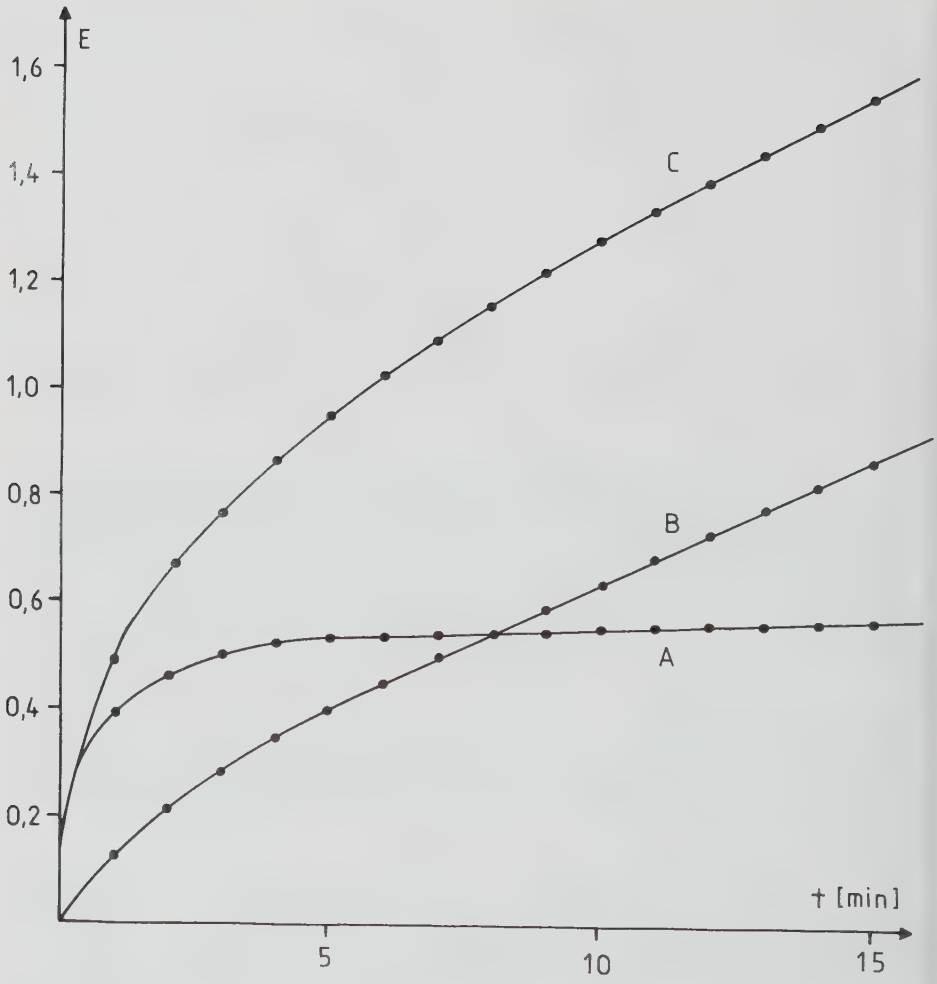


Abb. 2: Extinktion des aus PNPA freigesetzten p-Nitrophenols als Funktion der Zeit (pH 7, 2, 25°C)

Kurve A	: Verbindung 2	$6,6 \cdot 10^{-5}$ M
Kurve B	: Verbindung 1	$7 \cdot 10^{-5}$ M
Kurve C	: Kombination von 1 und 2	
	Cetyltrimethylammoniumbromid	$3,3 \cdot 10^{-5}$ M
	PNPA	$1,5 \cdot 10^{-3}$ M

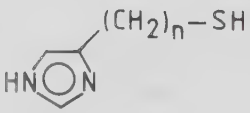
Die Kurven A und C verlaufen im steady-state-Bereich parallel. Kurve C ist eine reine Additionskurve aus A und B. Die Wechselzahlen von $6{,}2 \cdot 10^{-2}$ min^{-1} für die Imidazolverbindung und $7 \cdot 10^{-2}$ min^{-1} für die Mischmizelle entsprechen sich.

Die Diskrepanz dieser Messung zu der von G. Waldheim [10] durchgeführten Untersuchung läßt sich auf die mangelnde Mizellbildung der mit erheblichen Mengen Ausgangsprodukt verunreinigten quartären Imidazolbase zurückführen. Dadurch wurde ein flacherer Verlauf der Kurve A verursacht. In Kurve C war dann die kritische Mizellbildungskonzentration mit Sicherheit überschritten, weil beide Partner mengenmäßig gleich eingesetzt wurden. (CMC für die Imidazolbase $1 - 2 \cdot 10^{-5}$; gewählte Konzentration $6{,}6 \cdot 10^{-5}$ Imidazolverbindung, Schwefelkomizellbildner $7 \cdot 10^{-5}$).

Der Kinetikablauf ist folgendermaßen zu formulieren. Die Reaktion beginnt mit dem nucleophilen Angriff von S^- auf den Ester PNPA ("burst" der Kurve B und C). Die Imidazolreste liegen auf Grund ihrer schwächeren Nucleophilie noch frei vor. Nachdem alle S^--Gruppen durch Acetylierung blockiert sind, setzt im linearen Kurvenbereich (A und C) die Imidazolyse des Substrates ein.

Imidazol ist wohl in der Lage, den labilen Sauerstoffester p-Nitrophenylacetat zu spalten, es ist jedoch eine Acylübertragung vom Thiolester auf Imidazol durch die extrem ungünstige Gleichgewichtskonstante aus thermodynamischen Gründen nicht möglich. Die Stabilität von Thiolestern wird in der Literatur [9] mit dem Faktor $10^2 - 10^4$ mal größer als die entsprechenden Sauerstoffester mit gleichem pK-Wert, hier beide Male Acetyl, beschrieben. Dies ist verständlich, da, wie schon erwähnt, die Elektronegativität des Schwefels in der Größenordnung von Kohlenstoff liegt: S = 2,5; C = 2,5 (Pauling-Skala). Die C-S-Bindung entspricht also einer C-C-Bindung, während eine C-O-Bindung polarisiert ist (O = 3,5).

Ein Hinweis, der die kooperative Wechselwirkung zwischen den beiden funktionellen Gruppen SH und Imidazol ebenfalls in Frage stellt, konnte einer Arbeit von Schneider entnommen werden [8]. In dieser Studie wurde die kooperative Wirkung zwischen ideal benachbarten SH- und Imidazolfunktionen untersucht. Es wurden 4-Mercaptoalkylimidazole folgender Struktur synthetisiert



und Geschwindigkeitskonstanten der p-Nitrophenylacetat Hydrolyse ermittelt.

Es zeigte sich, daß der kooperative Effekt in einer vermehrten Bereitstellung von katalytisch wirksamen S^--Teilchen durch Wasserstoffbrückenbindung zum tertiären Imidazolstickstoff bestand. Bei steigendem pH-Wert wird das Imidazol als Protonenacceptor nicht mehr benötigt. Die Katalyse wird in zunehmendem Maße zu einer einfachen Thiol- plus Imidazol-Katalyse. Die Thiolester der Imidazolmercaptane zeigten auch bei alkalischem pH eine enorme Stabilität, obwohl die Voraussetzungen für eine intramolekulare Imidazolyse gegeben sind. Auf Grund dieser Tatsache hätte vom Autor der Schluß gezogen werden müssen, daß kein S→N-shift der Acetylgruppe erfolgt, wie postuliert wurde.

Parallel zu dieser Arbeit klärte Klotz [20] die Frage, wieweit ein Zusammenwirken von SH und Imidazol bei katalytischen Prozessen möglich ist, und bestätigte unabhängig und an einer anderen Stoffklasse die Befunde der vorliegenden Arbeit.

Es wurde eine Reihe von Peptiden synthetisiert, die als Bausteine Cystein und Histidin enthielten und als Spaltreagenz für PNPA eingesetzt wurden. Es zeigte sich, daß dem Imidazolkern beim nucleophilen Angriff der SH-Gruppe auf das Substrat keinerlei Mithilfe durch allgemeine Basenkatalyse zukam. Bei der Desacylierung des S-acylierten Peptides war das Histidin fast wirkungslos. Erst in Gegenwart eines thiolspezifischen Reagenz, beispielsweise DTNB, wird der reversible intramolekulare Transfer der Acetylgruppe zwischen Cystein und Histidin unterbrochen. Es wird der Rückangriff des stark nucleophilen Cysteins auf das Acetylhistidin verhindert und es resultiert eine effektive Desacylierung durch nucleophile Katalyse der Imidazolgruppe. Es wird also eine dritte funktionelle Gruppe benötigt, um das Thiol in eine unreaktive Form zu überführen, während das Acetylhistidin vom Wasser desacyliert wird.

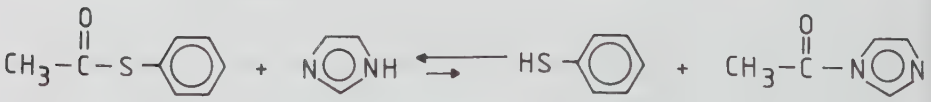
Dieser Typ von Mechanismus ist allerdings synthetisch sehr schwer zu erlangen. Es muß jedoch davon ausgegangen werden, daß SH-Proteasen wie Papain eine solche Reaktionsfolge verwirklicht haben.

E. Zusammenfassung

Es wurde eine Reihe von Polyethylenimin- und Polyvinylaminderivaten mit langen Alkylketten und Thiophenol- und Imidazolresten als funktionellen Gruppen hergestellt. Die Struktur der Polymeren wurde charakterisiert und deren katalytische Potenz zur Esterhydrolyse geprüft. Ein geringfügiger katalytischer Effekt polymer gebundenen Imidazols konnte bestätigt werden, ebenso die esterolytische Wirksamkeit polymer gebundenen Thiophenols.

Nicht bestätigt wurde die postulierte enzymähnliche Steigerung der katalytischen Wirkung einer Kombination von SH- und Imidazolresten. Diese Versuche wurden im Polymer- als auch im Mizellarsystem mit p-Nitrophenylacetat als Substrat durchgeführt.

Es konnte gezeigt werden, daß es sich bei der Acetylübertragung zwar um einen reversiblen Prozeß handelt, das Gleichgewicht jedoch weit zugunsten der Ausgangsprodukte verschoben ist. Diese Gleichgewichtskonstanten wurden sowohl für das Polymer- als auch für das Mizellarsystem ermittelt.



Nur durch Blockierung der SH-Gruppen wäre eine Verschiebung des Gleichgewichts möglich. Da dazu bislang nur irreversible Reaktionen wie eine Disulfidbildung mit 5, 5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure) durchgeführt werden können, erschien eine Weiterführung dieser Arbeit nicht mehr sinnvoll.

EXPERIMENTELLER TEIL

A. Allgemeine Methoden

I. Folgende Geräte wurden verwendet:

Schmelzpunkte : Mettler Fp 5
(korrigiert durch Eichsubstanzen der Firma Reichert, Wien)

IR-Spektren : Beckmann IR 20 A
(als KBr-Presslinge)

NMR-Spektren : Varian NMR-Spektrometer T 60
(TMS als innerer Standard)

Kinetik Messungen : Zeiss PMQ 3
mit temperierbarem Küvettenhalter

Als Abkürzungen werden verwendet:

AIBN = α,α' Azoisobutyronitril
CTAB = Cetyltrimethylammoniumbromid
DMF = Dimethylformamid
DTNB = 5, 5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
DTE = Dithioerythrit
PEI = Polyethylenimin
PVA = Polyvinylamin
PNPA = p-Nitrophenylacetat

II. Allgemeine Meßmethoden

1. Quantitative Bestimmungen von SH- und -S-S-Gruppen

Zur Gehaltsbestimmung reaktionsfähiger SH-Gruppen mußten die Acetylgruppen S-Acyl-geschützter Thiophenolderivate hydrolytisch abgespalten und Disulfidgruppen reduziert werden. Die Lösungsmittel für die einzelnen Substanzproben und die für die Hydrolyse vorgesehene Natronlauge wurden 15 bis 30 Minuten mit Argon durchgespült. Vor Aktivierung der SH-Verbindungen wurde das Reaktionsgefäß ebenfalls mit Argon luftfrei gemacht und danach mittels einer Silikonkappe fest verschlossen. Die Probenentnahme erfolgte mit Hamilton-Spritzen. Auch sie wurden vor dem Aufziehen der Lösungsmittel, der Natronlauge und der Analysenlösung mit Argon luftfrei gespült. Das Vakuum, das bei jeder Probenentnahme entstand, wurde mit Argon wieder aufgefüllt. Alle Meßdaten stellen Mittelwerte aus 3 Messungen dar.

a) Gehaltsbestimmung von SH-Gruppen

Die Proben werden in Methanol gelöst und mit einem Überschuß Natronlauge versetzt. Nach ca. 5 Minuten werden jeweils eine bestimmte μl-Zahl dieser Stammlösungen in die mit Tris/HCl-Pufferlösung pH 8,1 gefüllte Küvette injiziert. Zu den klaren Lösungen werden dann jeweils entsprechende μl einer 10^{-2} molaren Lösung in Trispuffer pH 8,1 des Ellman-Reagenzes im leichten Überschuß hinzugegeben und nach zweiminütiger Wartezeit die Extinktion bei 412 nm abgelesen. ε des Spaltproduktes 2-Nitro-5-mercaptobenzoesäure beträgt 13600 für pH 8,1.

b) Bestimmung von Disulfid-Gruppen

Der Gehalt des oxydierten Schwefelanteils wurde nach der von Zahler und Cleland beschriebenen Methode [13] durchgeführt. Die Proben werden in Tris-Puffer pH 9 gelöst und ein Überschuß Dithioerythrit -Lösung ("DTE") zugesetzt. Die Proben werden 30 Minuten unter Luftausschluß stehengelassen. Danach wird ein Aliquot entnommen und der Dithiolüberschuß mit einer 10^{-3}

molaren Natriumarsenit-Pufferlösung pH 8,1 in der Küvette komplexiert. Nach dreiminütiger Wartezeit werden nach Zugabe von DTNB-Lösung die Extinktionen bei 412 nm in Abhängigkeit der Zeit gemessen. Bedingt durch den Zerfall des DTE-Arsenit-Komplexes steigen die Extinktionen laufend. Der Extinktionswert zur Zeit t_o wird graphisch ermittelt.

2. Kinetikmessung

Die Esterspaltung des p-Nitrophenylacetats (entsprechende µl einer Stammlösung in abs. ETOH) wurde spektralphotometrisch bei 400 nm und einer Spaltöffnung von 0,03 mm mit einem PMQ 3 Photometer verfolgt. Die Meßtemperatur wurde durch Anschluß des Küvettenhalters an ein einen Thermostaten auf 25° C gehalten.

Der pH-Wert der Trispufferlösung betrug 7,2. Jede frisch hergestellte Pufferlösung wurde vor dem ersten Gebrauch mittels eines pH-Meters auf ihren pH-Wert überprüft. Die Vergleichsküvette enthielt bis auf den Katalysator die gleiche Reaktionslösung wie die Meßküvette, so daß der Extinktionswert der Eigenhydrolyse des p-Nitrophenylacetats automatisch von der Extinktion in der Meßküvette substrahiert wurde.

Die Meßreihen stellen Mittelwerte von durchschnittlich drei Messungen dar, die jeweils unter den gleichen Reaktionsbedingungen durchgeführt wurden und keine auffallenden Abweichungen im Substratumsatz erkennen ließen.

Zur Umrechnung der Extinktionswerte auf die hydrolysierte Substratmenge wird unabhängig von den geringfügigen Unterschieden in der Zusammensetzung der Reaktionslösungen der molare Extinktionskoeffizient für p-Nitrophenol $\varepsilon = 10700$ bei pH 7,2 eingesetzt.

B. Polyethyleniminderivate

I. Thiophenolhaltige Polyethyleniminderivate

1. Trocknung von Polyethylenimin

Die 50 %ige wäßrige Lösung des Polyethylenimins (MG: ~ 60. 000) wird mit der dreifachen Menge Ethanol versetzt und am Rotationsverdampfer eingeengt. Der Rückstand wird noch dreimal mit Ethanol versetzt und zur Trockene eingedampft. Dann wird das Polymere in absolutem Ethanol gelöst und wieder zur Trockene eingedampft und am Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Dieses wasserfreie Polymere wird zu den polymeranalogen Umsetzungen verwendet.

2. Synthese der Thiophenolkomponente

a) Darstellung von S-Acetyl-p-mercaptobenzoesäure (10)

110, 0 g p-Aminobenzoesäure (0, 8 Mol) werden nach bekannter Vorschrift [11] mit 55, 2 g Natriumnitrit (0, 8 Mol) diazotiert und das Diazoniumsalz mit 150, 0 g Kaliumethylxanthogenat (0, 93 Mol) zum entsprechenden Xanthogensäurephenylester umgesetzt. Dieser wird verseift und danach die mit HCl ausgefällte p-Mercaptobenzoesäure getrocknet. Die teilweise aus dem Rohprodukt (78, 0 g) entstandene 4, 4'-Dithiobisbenzoesäure wird mit einem Überschuß Zinkstaub in 500 ml Eisessig suspendiert und sechs Stunden unter Rückfluß erhitzt [21]. Das feste Material wird abgesaugt und schnell mit 500 ml heißem Wasser in dem zuvor 50, 0 g KOH gelöst werden, suspendiert und die unlöslichen Bestandteile unverzüglich abfiltriert. Die alkalische Lösung wird schnell abgekühlt mit 100, 0 g Eis und insgesamt 150, 0 g Acetanhydrid in kleinen Portionen unter kräftigem Schütteln versetzt. Das Präzipitat wird abfiltriert und die Lösung zur Vervollständigung der Ausfällung mit einigen Millilitern 6 N-HCl versetzt. Die gesammelten Niederschläge werden aus Chloroform zweimal umkristallisiert.

Ausbeute : 60,0 g (60,5 % d. Th.)
Schmp. Lit.[22] : 202,5 - 203,5 °C
Schmp. gef. : 203 °C

b) Darstellung des S-Acetyl-p-mercaptobenzoesäurechlorids (11)

2,0 g (0,01 Mol) der Verbindung 10 werden mit 16 ml Thioylchlorid (0,2 Mol, 20facher Überschuß und einer Spur DMF 2 Stunden im Ölbad auf 70° C erhitzt. Anschließend wird das Thionylchlorid im Vakuum abdestilliert und das Säurechlorid mehrmals in Ether gelöst und am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft. Die quantitative Umsetzung der Verbindung 10 zum Säurechlorid 11 wurde an Hand des IR- und NMR-Spektrums bewiesen.

IR (KBr - Film) : $\bar{\nu}$ = 1770 cm^{-1} (Säurechlorid)
es fehlt die Bande : $\bar{\nu}$ = 1700 cm^{-1} (Carbonsäure)

NMR : ($CDCl_3$) (ppm)= 2,5 [3H, s, CH_3],
7,9 [4H, AA'BB' Ar]

Für die polymeranalogen Umsetzungen wurde Verbindung 11 jeweils neu hergestellt.

3. Darstellung der Polyethyleniminderivate (Poly 1-3)

a) Poly 1, berechneter Besetzungsgrad 10 %

2,15 g (50 m mol) PEI und 1,3 g (10 m mol) Diisopropylethylamin (Hünigbase) werden in 20 ml frisch destilliertem N-Methylpyrrolidon gelöst und tropfenweise mit 1,1 g (5 m mol) Säurechlorid 11, in N-Methylpyrrolidon gerade gelöst, versetzt. Die Lösung wird zwei Stunden bei Zimmertemperatur gerührt. Anschließend wird N-Methylpyrrolidon im Hochvakuum abdestilliert und der Rückstand in Methanol gelöst.

Zur Abtrennung nicht umgesetzter Monomerer und der Hünigbase wird der Ansatz über eine Sephadex LH 20 Säule (36 x 2, 5 cm) chromatographiert. Das Eluat wird in mehreren Fraktionen geteilt und mittels DC (Fließmittel: Chloroform/Methanol 95:5) auf Monomerfreiheit geprüft. Die Polymerlösung wird am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und bei 70 - 90° im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ausbeute: 1, 1 g

NMR: ($CDCl_3$) δ (ppm) = 2, 2 - 3, 2 [4 H, s breit -N-CH_2-CH_2-] ,
2, 5 [3 H, s, CH_3] H,
4, 3 [1 H, s, -NH-] ,
7, 9 [4 H, AA', BB', Ar]

b) Poly 2, berechneter Besetzungsgrad 20 %

Synthese und Reinigung erfolgt wie bei Poly 1

Einwaagen: 2, 15 g (50 m mol) PEI
2, 6 g (20 m mol) Diisopropylethylamin
2, 2 g (10 m mol) Verbindung 11

Ausbeute: 1, 6 g

NMR: ($CDCl_3$) δ (ppm) = 2, 2 - 3, 2 [4 H, s breit -N-CH_2-CH_2-]
H
2, 5 [3 H, s, CH_3],
4, 3 [1 H, s, -NH-] ,
7, 9 [4 H, AA', BB', Ar]

c)Poly 3, berechneter Besetzungsgrad 50 %

Synthese und Reinigung erfolgt wie bei Poly 1

Einwaagen: 2,15 g (50 m mol) PEI
6,5 g (50 m mol) Diisopropylethylamin
5,5 g (25 m mol) Verbindung 11

Ausbeute: 1,7 g

NMR: ($CDCl_3$) δ (ppm) = 2,2 - 3,2 [4 H, s breit -N-CH_2-CH_2-]
2,5 [3 H, s, CH_3], H
4,3 [1 H, s, -NH-],
7,9 [4 H, AA', BB', Ar]

Nur Polymer 1 war klar wasserlöslich und konnte zu Kinetikmessungen eingesetzt werden.

4. Charakteristik des Polymeren 1

Der Gehalt an katalytisch wirksamen funktionellen Gruppen der Polymerkette wurde, wie im theoretischen Teil beschrieben, mit Hilfe der Elementaranalyse ermittelt.

5. SH- und S-S-Gruppenbestimmung des Polymeren 1

a) SH-Gruppenbestimmung

3,40 mg Poly 1 werden in 4,00 ml H_2O gelöst und 50 µl 0,1 N-NaOH zugesetzt.

Nach 20minütiger Reaktionszeit wurde das ausgeflockte Polymere mit 50µl 0,1 N-HCl wieder in Lösung gebracht.

Stammlösung : 10^{-3} molar bezogen auf Val S.

Meßlösung : 2820 µl Puffer pH 8,1
150 µl Poly 1 ($5 \cdot 10^{-5}$)
30 µl DTNB (10^{-4})
3000 µl

abgelesene Extinktion : 0,232

berechnete Extinktion : 0,680

Es konnten maximal 34,1 % SH-Gruppen durch Verseifung des Esters freigesetzt werden. Auch nach Verlängerung der Reaktionszeit wurden keine höheren Extinktionen gefunden.

b) S-S-Gruppenbestimmung

6,70 mg Poly 1 werden in 5 ml Tris-Puffer pH 9 gelöst und mit 5 ml einer methanolischen 10^{-2} molaren DTE-Lösung gemischt und 30 Minuten stehengelassen.

Stammlösung : 10^{-3} molar bezogen auf 1 Val S.

Meßlösung : 2820 µl Arsenit-Pufferlösung pH 8,1 (10^{-3})
150 µl Poly 1 ($5 \cdot 10^{-5}$)
nach 3 Minuten Zugabe von 30 µl DTNB (10^{-4})
3000 µl

Extinktion bei t_o = 0,240

Dieser Wert entspricht der nach Verseifung unter a) gefundenen Extinktion. Es lagen keine oxidierten SH-Gruppen vor.

6. Hydrolytische Aktivität des Polymeren 1 gegenüber p-Nitrophenylacetat

6,73 mg Poly 1 werden in 900 µl H_2O gelöst und 50 µl 1 N-NaOH zugesetzt. Nach 20 Minuten Reaktionszeit wird mit 50 µl 1 N-HCl neutralisiert.

Stammlösung: 10^{-2} molar

Meßlösung : 1980 µl Puffer pH 7,2
870 µl Poly 1 10^{-3} M bezogen auf freie SH-Gruppen
150 µl PNPA 10^{-4} M
3000 µl

Hydrolyse von PNPA in Gegenwart des Poly 1

[s]	E	log S - 6
30	0,180	1,920
60	0,209	1,906
90	0,238	1,891
120	0,259	1,880
150	0,281	1,868
180	0,306	1,845

Steigung $k' = \frac{0,02}{0,75}$

$k_1 = k' \cdot 2,303 = 0,062 \ \text{min}^{-1}$

$k_2 = \frac{0,062}{10^{-3}} = 62 \ \text{Mol}^{-1} \ \text{min}^{-1}$
$= 1,03 \ \text{Mol}^{-1} \ \text{s}^{-1}$

II. Polyethyleniminderivate mit Alkylgruppen und Imidazol

1. Synthese der Polymeren Poly 4 - 6

a) Darstellung Poly 4, berechneter Besetzungsgrad 10 %

2,15 g PEI (50 m mol) werden in 30 ml absolutenETOH mit 1,9 g Stearyljodid (5 m mol) versetzt und 10 Stunden auf dem Ölbad erhitzt. Nach Sephadexfiltration und Trocknung des Polymeren wurde der Besetzungsgrad mit Stearylgruppen an Hand des NMR-Spektrums durch Vergleich der Signalhöhen der Stearylprotonen mit den Ethyleniminprotonen festgestellt.

Ausbeute : 1,7 g

Stearyljodid wurde durch Finkelsteinaustausch aus Stearylbromid hergestellt[23].

NMR : (CD_3OD) δ (ppm) = 0,9 [3 H, s, CH_3]
1,4 [32 H, s, $(-CH_2-)_{16}$]
1,9 [2 H, s, $(-CH_2-N)$]
2,8 [4 H, s, $-\underset{H}{N}-CH_2-CH_2-$]
4,3 [1 H, s, -NH-]

Die Umsetzung ist quantitativ verlaufen. Poly 4 ist in Wasser nicht klar löslich.

b) Darstellung Poly 5, berechneter Besetzungsgrad 5 %

Synthese und Reinigung erfolgt wie Poly 4

Einwaagen: 2,15 g (50 m mol) PEI
0,95 g (2,5 m mol) Stearyljodid

Ausbeute : 1,5 g

NMR : (CD_3OD) δ (ppm) = 0,9 [3 H, s, CH_3]
1,4 [32 H, s, $(-CH_2)_{16}$]
1,9 [2 H, $(-CH_2-N)$]
2,8 [4 H, s, $-\underset{H}{N}-CH_2-CH_2-$]
4,3 [1 H, s, -NH-]

Der gefundene Besetzungsgrad beträgt 5 %. Poly 5 ist in Wasser nicht klar löslich.

c) Darstellung Poly 6, berechneter Besetzungsgrad 2,5 %

Synthese und Reinigung erfolgt wie Poly 4

Einwaagen : 2,15 g (50 m mol) PEI
0,475 g (1,25 m mol) Stearyljodid

Ausbeute : 1,4 g

NMR : (CD_3OD) δ (ppm) = 0,9 [3 H, s, $-CH_3$]
1,4 [32 H, s, $(-CH_2-)_{16}$]
1,9 [2 H, s, $(-CH_2-N)$]
2,8 [4 H, s, $-\underset{H}{N}-CH_2-CH_2-$]
4,3 [1 H, s, -NH-]

Der gefundene Besetzungsgrad beträgt 2,5 %. Poly 6 ist in Wasser nicht klar löslich.

2. Synthese des Polymeren 7

Berechneter Besetzungsgrad 5 %

4,3 g PEI (100 m mol) werden in 60 ml absolutem ETOH mit 1,48 g Dodecyljodid (5 m mol) und 1,3 g Hünigbase 10 m mol versetzt und zehn Stunden auf 60° im Ölbad erhitzt.

Nach zweimaliger Sephadexfiltration wurde das monomerfreie Produkt im Hochvakuum getrocknet.
Ausbeute : 2,7 g

Der Besetzungsgrad mit Dodecylgruppen wurde an Hand des NMR-Spektrums durch Vergleich der Dodecylprotonen mit den Ethyleniminprotonen ermittelt.

NMR: (CD_3OD) δ (ppm) = 0,9 [3 H, s, $-CH_3-$]
1,4 [20H, s, $(-CH_2-)_{10}$]
1,9 [2 H, s, $(-CH_2-N)$]
2,8 [4 H, s, $-\underset{H}{N}-CH_2-CH_2-$]
4,3 [1 H, s, -NH-]

Der gefundene Besetzungsgrad beträgt 3,5 %. Eine monomere Einheit besitzt ein Durchschnittsmolekulargewicht von 49,30.

3. Synthese von 4-(5)-Chlormethylimidazol-hydrochlorid (14)

a) 4-(5)-Hydroxymethyl-imidazol-hydrochlorid (13)

200, 0 g basisches Kupfercarbonat (0, 9 Mol); 650 g konz. Ammoniaklösung, 00 g Formaldehydlösung und 81,0 g Fructose (0,45 Mol) in 1,4 l Wasser werden nach bekannter Vorschrift [15] umgesetzt. Das entstandene Imidazolderivat wird mit 60,0 g Pikrinsäure ausgefällt und durch Kristallisation gereinigt. Das auf diese Weise gewonnene Pikrat mit einem Fließpunkt von 203 °C (Lit. [15]: 205 - 207 °C) wird in einer Mischung von 120 ml konz. Salzsäure und 250 ml Wasser gelöst, die freigesetzte Pikrinsäure durch Toluolextraktion entfernt und die eingedampfte wäßrige Phase laut Vorschrift aufgearbeitet.

Ausbeute : 31, 0 g (51 % d. Th.)
Schmp. Lit. [15] : 108 - 109 °C
Schmp. gef. : 109 °C

b) 4-(5)-Chlormethyl-imidazol-hydrochlorid (14)

Eine Suspension von 12, 0 g der Verbindung 13 (0,09 Mol) in 40 ml absolutem Toluol wird nach Lit. [16] mit 21, 0 g Thionylchlorid in 15 ml absolutem Toluol umgesetzt. Das feinpulvrige Rohprodukt wird aus 40 ml absolutem ETOH umkristallisiert.

Ausbeute : 10, 5 g (76 % d. Th.)
Schmp. Lit. [16] : 139 °C
Schmp. gef. : 141 °C

4. Synthese des Polymeren 8

2,46 g Poly 7 (50 m mol) werden in 50 ml absolutem ETOH mit 0,9 g Hünigbase (7 m mol) und einer Spatelspitze KJ versetzt. Dann wird langsam eine Lösung von 0,383 g Chlormethylimidazol-HCl (2,5 m mol) in 10 ml absolutem ETOH zugetropft. Der Reaktionsansatz wird 6 Stunden am Rückfluß erhitzt. Die Lösung wird fast bei zur Trockene eingeengt und in 10 ml H_2O gelöst und filtriert. Anschließend wird die Polymerlösung über 30,0 g stark basischen Ionenaustauscher gegeben. Das Eluat wird zur Trockene eingedampft, in Methanol gelöst und über eine Sephadex LH 20-Säule gegeben. Die monomerfreien Fraktionen (DC Kontrolle in MeOH als Fließmittel) werden vereinigt eingeengt und am Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Ausbeute : 1,8 g

NMR : (CD_3OD) δ (ppm) = 0,9 [3H, s, CH_3]
1,4 [20H, s, $(-CH_2-)_{10}$]
1,9 [2H, s, $(-CH_2-N)$]
2,8 [4H, s, $-\underset{H}{N}-CH_2-CH_2-$]
4,3 [1H, s, -NH-]
7,4 [1H, s, Imidazol]
8 [1H, s, Imidazol]

Nach NMR-Auswertung ergibt sich folgende Elementarzusammensetzung:

6,67 % Imidazolreste
5,78 % Dodecylgruppen

Das Durchschnittsmolekulargewicht einer monomeren Einheit beträgt 58,14.

5. Hydrolytische Aktivität des Polymeren 8 gegenüber p-Nitrophenylacetat und Vergleich mit monomerem Imidazol

a) Kinetik der PNPA-Verseifung in Gegenwart von Poly 8

21,77 mg Poly 8 werden in 25 ml Trispuffer pH 7,2 gelöst.

Stammlösung : 10^{-3} M bezogen auf Imidazol

Meßlösung : 2820 µl Puffer pH 7,2
150 µl Poly 8 $5 \cdot 10^{-5}$ M
30 µl PNPA 10^{-3} M
3000 µl

Hydrolyse von PNPA in Gegenwart des Poly 8

[min]	E	[min]	E	[min]	E	[min]	E
1	0,031	6	0,096	11	0,163	16	0,228
2	0,044	7	0,110	12	0,175	17	0,241
3	0,057	8	0,123	13	0,188	18	0,254
4	0,070	9	0,136	14	0,202	19	0,267
5	0,083	10	0,150	15	0,215	20	0,280

Berechnung der Wechselzahl:

E_1-E_2 = Differenz zweier Extinktionen pro Minute im linearen Teil der Kurve

$$v = \frac{E_1 - E_2}{\cdot d} = \frac{0,013}{10700} = 12 \cdot 10^{-7} \text{ Mol} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$WZ = \frac{12 \cdot 10^{-7}}{5 \cdot 10^{-5}} = 2,4 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

b) Kinetik der PNPA-Verseifung in Gegenwart monomeren Imidazols

1,7 mg Imidazol werden in 25 ml Trispuffer pH 7,2 gelöst.

Stammlösung : 10^{-3} M

Meßlösung : 2820 µl Puffer pH 7,2
150 µl IM $5 \cdot 10^{-5}$ M
30 µl PNPA 10^{-3} M
3000 µl

Hydrolyse von PNPA in Gegenwart von Imidazol

[min]	E	[min]	E	[min]	E	[min]	E
1	0,021	5	0,068	9	0,107	13	0,146
2	0,034	6	0,079	10	0,117	14	0,155
3	0,046	7	0,089	11	0,127	15	0,164
4	0,057	8	0,098	12	0,137		

Berechnung der Wechselzahl:

$$v = \frac{0,0095}{10700} = 8,8 \cdot 10^{-7} \text{ Mol} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$WZ = \frac{8,8 \cdot 10^{-7}}{5 \cdot 10^{-5}} = 1,76 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

III. Trifunktionelles Polyethyleniminderivat

1. Synthese des Polymeren 9

Berechneter Besetzungsgrad 5 %

116,3 mg des Polymeren 8 werden in 5 ml N-Methylpyrrolidon gelöst. Die Lösung wird mit Argon luftfrei gemacht. 21,46 mg Säurechlorid 11, ebenfalls unter Argonatmosphäre in 5 ml N-Methylpyrrolidon gelöst, werden unter Rühren rasch zugetropft.

Stammlösung: 10^{-2} M bezogen auf Thiophenolgruppen

Eine Bestimmung an freien SH-Gruppen und damit der Selbstaktivierung des polymeren Katalysators konnte nicht vorgenommen werden, da das Polymer beim Einspritzen in die Pufferlösung ausfiel. Diese Wasserunlöslichkeit verhinderte auch den Einsatz zu kinetischen Messungen.

2. Darstellung des Polymeren 10

Berechneter Besetzungsgrad 2,5 %

97,8 mg des Polymeren 7 werden in 5 ml N-Methylpyrrolidon gelöst. 10,7 mg Säurechlorid 11, in 5 ml N-Methylpyrrolidon gelöst, werden unter Rühren rasch zugetropft.

Stammlösung: $5 \cdot 10^{-3}$ M, bezogen auf Thiophenolgruppen

Das Produkt ist ebenfalls wasserunlöslich.

C. Polyvinylaminderivate

I. Synthese der Matrix

a) Synthese von N-Vinylacetamid (16)

Die Darstellung erfolgte mit leichter Abwanderung nach Lit. [17]. 118,3 g Acetamid, 29,8 g Acetaldehyd und 2,8 ml 6M-H_2SO_4 werden in den Kolben eines Rotationsverdampfers mit wirksamem Intensivkühler gegeben und das Wasserbad auf etwa 100° C erhitzt. Der Reaktionsansatz wird 10 Minuten am Rotationsverdampfer bewegt bis die Mischung homogen geworden ist. Dann wird die Heizquelle entfernt. Ethylenbisamid kristallisiert unter exothermer Reaktion aus. 13,0 g $CaCO_3$ und etwas Glaswolle werden vorsichtig hinzugefügt und der Reaktionskolben mit einer Vakuumdestillationsapparatur versehen. Das Ölbad wird auf 200° C erhitzt und im Hochvakuum destilliert. Die erste farblose Fraktion besteht aus Wasser und Acetamid. Das folgende rötlich-orange Destillat ist eine Mischung aus N-Vinylacetamid und Acetamid. Diese Fraktion wird geschmolzen mit 100 ml Isopropanol verdünnt und über Nacht auf 5° C gekühlt. Das ausgefallene Acetamid wird abgetrennt und das rotbraune Filtrat, das etwa 40 % Vinylacetamid enthält, ohne weiteren Reinigungsschritt zur Polymerisation eingesetzt.

b) Polymerisation zu Polyvinylacetamid (17)

Die Vinylacetamidlösung wird mit 100 ml Isopropanol verdünnt, 20 Minuten mit Argon durchspült und erhitzt. Dann wird eine Lösung von 1,0 g AIBN in 4 ml Aceton zugefügt und die Reaktionslösung 3 Stunden am Rückfluß unter Rühren erhitzt. Die Polymerlösung wird im Vakuum eingeengt und das dicke orangefarbene Öl durch tropfenweise Zugabe von 600 ml kräftig gerührtem Aceton ausgefällt. Das Präzipitat wird abgetrennt, sorgfältig mit Aceton gewaschen und bei 50° C im Vakuum getrocknet.

c) Darstellung von Polyvinylamin - HCl (18)

Das Polyvinylacetamid 17 wird in 20 ml H_2O gelöst, 10 ml 12 N-HCl zugefügt und 30 Stunden am Rückfluß erhitzt. Ausgefallenes unvollständig hydrolysiertes Produkt wird durch Zugabe von Wasser wieder in Lösung gebracht. Die noch warme Lösung wird in kräftig gerührten Isopropylalkohol getropft, der Niederschlag abfiltriert mit Isopropanol gewaschen und im Hochvakuum getrocknet. Das hellzimtfarbene Produkt wird im Mörser zu einem weißen Pulver zerrieben.

Ausbeute: 15, 0 g
Laut NMR weist das Produkt noch 20 % Acetylreste auf.

Die Synthese wurde ein zweites Mal durchgeführt. Hier konnte durch Verlängerung der Verseifungsdauer und höher konzentrierter Salzsäure eine quantitative Abspaltung der Acetylgruppen erreicht werden. Dieses Produkt wurde jedoch nicht mehr zu Messungen eingesetzt.

d) Darstellung von Polyvinylamin (19)

4, 0 g Polyvinylamin HCl (18) werden in Wasser gelöst und über 100 g stark basischen Ionenaustauscher gegeben. Im Eluat konnten keine Chloridionen nachgewiesen werden.

Das Polymer wird im Hochvakuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und zu Substitutionsreaktionen eingesetzt.

Ausbeute: 3, 0 g
NMR: (CD_3OD) δ ppm = 1, 2-1, 8 [2H, s breit, CH_2]
2 [3H, s, Acetyl]
2, 6 [1H, s, -CH-
- N -]
4 [2H, s, NH_2]

II. Polyvinylaminderivate mit zwei funktionellen Gruppen

1. Synthese der Polymeren 11 und 12

a) Darstellung des Poly 11, berechneter Besetzungsgrad
2,5 % Dodecyl-, 10 % Imidazolreste

0,86 g PVA (20 m mol) werden in 25 ml absolutem ETOH gelöst, 0,13 g Hünigbase (1m mol) und 0,150 g Dodecyljodid (0,5 m mol) zugefügt und 6 Stunden am Rückfluß erhitzt. Dann werden 0,306 g (2 m mol) Chlormethylimidazol-HCl in 10 ml absolutem ETOH gelöst, langsam zugetropft. Eine Spatelspitze KJ und 0,650 g Hünigbase (5m mol) werden ebenfalls zugesetzt. Der Ansatz wird 6 Stunden am Rückfluß gekocht und das Produkt isoliert. Das Polymer wird in Wasser gelöst und über einen basischen Ionenaustauscher (40 g) geschickt. Anschließend wird eine Sephadexfiltration durchgeführt. Die monomerfreien Fraktionen werden wie üblich aufgearbeitet.

NMR: (CD_3OD) δ(ppm) =

0,9	[3H, s, CH_3]
1,2-1,8	[(2H, s breit, CH_2]
1,4	[(20H, s, $(-CH_2)_{10}$]
1,9	[(2H, s, $(-CH_2-N)$]
2	[(3H, s Acetyl]
2,6	[(1H, s, -CH- -N-]
4	[2H, s, NH_2]
7,4	[1H, s, Imidazol]
8	[1H, s, Imidazol]

Nach NMR-Auswertung besitzt Poly 11:

2,4 % Dodecylgruppen
7,5 % Imidazolreste

Das Durchschnittsmolekulargewicht einer monomeren Einheit beträgt 61,52. Poly 11 ist klar wasserlöslich.

b) Darstellung des Poly 12, berechneter Besetzungsgrad
5 % Dodecyl- und 20 % Imidazolreste

Synthese und Reinigung erfolgt wie Poly 11

Ausbeute: 0,6 g

Einwaagen: 0,86 g PVA (20 m mol)
0,3 g Dodecyljodid (1 m mol)
0,26 g Hünigbase (2 m mol)

0,612 g Chlormethylimidazol HCl (4 m mol)
1,3 g Hünigbase (10 m mol)

NMR: (CD_3OD) δ (ppm) =
0,9 [3H, s, CH_3]
1,2-1,8 [2H, s breit, CH_2]
1,4 [20H, s, $(-CH_2)_{10}$]
1,9 [2H, s, $(-CH_2-N)$]
2 [3H, s, Acetyl]
2,6 [1H, s, -CH-N-]
4 [2H, s, NH_2]
7,4 [1H, s, Imidazol]
8 [1H, s, Imidazol]

Laut NMR-Spektrum besitzt Poly 12:
5,1 % Dodecylgruppen
11,6 % Imidazolreste

Das Durchschnittsmolekulargewicht einer monomeren Einheit beträgt 69,35. Poly 12 ist klar wasserlöslich.

2. Hydrolytische Aktivität der Polymeren 11 und 12 gegenüber p-Nitrophenylacetat

a) Kinetik Poly 11

8,2 mg Poly 11 werden in 10 ml Trispuffer pH 7,2 gelöst.

Stammlösung: 10^{-3} M

Meßlösung : 2820 µl Puffer pH 7,2
150 µl Poly 11 $5 \cdot 10^{-5}$ M
30 µl PNPA 10^{-3} M
3000 µl

Hydrolyse von PNPA in Gegenwart von Poly 11

[min]	E	[min]	E
1	0,045	9	0,165
2	0,065	10	0,180
3	0,074	11	0,194
4	0,089	12	0,209
5	0,105	13	0,225
6	0,120	14	0,240
7	0,135	15	0,256
8	0,150		

$$v = \frac{0,015}{10700} = 1,4 \cdot 10^{-6} \text{ Mol} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$WZ = \frac{1,4 \cdot 10^{-6}}{5 \cdot 10^{-5}} = 2,8 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

b) Kinetik Poly 12

5,96 mg Poly 12 werden in 10 ml Trispuffer pH 7,2 gelöst.
Stammlösung: 10^{-3} M

Meßlösung : 2820 µl Puffer pH 7,2
150 µl Poly 12 $5 \cdot 10^{-5}$ M
30 µl PNPA 10^{-3} M
3000 µl

Hydrolyse von PNPA in Gegenwart von Poly 12

[min]	E	[min]	E
1	0,040	9	0,204
2	0,060	10	0,225
3	0,080	11	0,245
4	0,102	12	0,265
5	0,122	13	0,286
6	0,145	14	0,307
7	0,165	15	0,326
8	0,184		

$$v = \frac{0,020}{10700} = 1,86 \cdot 10^{-6} \text{ Mol} \cdot \text{min}^{-1}$$

$$WZ = \frac{1,86 \cdot 10^{-6}}{5 \cdot 10^{-5}} = 3,72 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

III. Polyvinylaminderivate mit drei funktionellen Gruppen

1. Synthese des Polymeren 13

Berechneter Besetzungsgrad 10 %

138, 8 mg des Polymeren 12 werden in 10 ml N-Methylpyrrolidon gelöst und mit Argon luftfrei gemacht. 42, 9 mg Säurechlorid 11, ebenfalls unter Argonatmosphäre in 10 ml N-Methylpyrrolidon gelöst, werden unter Rühren rasch zugetropft.

Stammlösung: 10^{-2} M, bezogen auf Thiophenolgruppen

2. Gehaltsbestimmung der SH-Gruppen

Meßlösung: 2955 µl Puffer pH 8, 1
15 µl Poly 13 ($5 \cdot 10^{-5}$ M)
30 µl DTNB (10^{-4} M)

berechnete Extinktion bei quantitativer Abspaltung der S-Schutzgruppen durch die Imidazolreste am Polymeren: 0, 680, gefundene Extinktion nach zweiminütiger Wartezeit: 0, 090

3. Bestimmung der Gleichgewichtskonstante des Polymeren 13

Meßlösung:

[min]	E	[min]	E
2	0, 090	7	0, 117
3	0, 096	8	0, 122
4	0, 101	9	0, 127
5	0, 107	10	0, 132
6	0, 112		

E zur Zeit t_o = 0, 080
Konz. an SH = $0, 59 \cdot 10^{-5}$ M

$$K = \frac{[IM]\,[R\text{-}S\,Ac]}{[Ac\text{-}IM\;\;R\text{-}SH]} = \frac{5 \cdot 10^{-5} \cdot 5 \cdot 10^{-5}}{0, 59 \cdot 10^{-5}\;\;2} = 71, 4$$

D. Mizellarderivate

1. Synthese des Kinetikzwischenproduktes 3

a) 4,4'-Bis-(N-Methyl-N-stearyl-carbamoyl)-diphenylsulfid (24)

Die Darstellung der Verbindung 24 erfolgte nach Lit. [10]

Ansatz : 0,03 Mol
Ausbeute : 3,5 g (60 % d. Th.)
Schmp. Lit. : 65 - 66 °C
Schmp. gef. : 60 °C

b) 4-(N-Methyl-N-stearylaminomethyl)-S-(p-acetyl)-thiophenol (26)

3,5 g der Verbindung 24 (0,004 Mol) in 30 ml absolutem Ether werden in einer Suspension von 1,0 g Litiumalanat durch einstündiges Erhitzen am Rückfluß reduziert. Nach der Hydrolyse wird der Ether abgedampft, der Rückstand stark angesäuert und das wasserunlösliche Ammoniumsalz abfiltriert. Der gewaschene Rückstand wird in 50 ml $CHCl_3$ gelöst und mit einem großen Überschuß von Acetanhydrid geschüttelt. Durch gleichzeitige Zugabe von eisgekühlter Na_2CO_3-Lösung wird die wäßrige Phase alkalisch gehalten. Nach ungefähr 15minütiger Acetylierungsdauer wird die Chloroformphase abgetrennt und getrocknet. Der Rückstand der eingedampften Chloroformphase wird zweimal aus Aceton umkristallisiert.

Ausbeute : 1,0 g (28 % d. Th.)
NMR : ($CDCl_3$) δ (ppm) = 0,9 [3H, s, CH_3]
1,3 [32H, s, $(-CH_2-)_{16}$]
1,9 [2H, s, $(-CH_2-N)$]
2,2 [3H, s, $N-CH_3$]
2,4 [3H, s, Acetyl]
3,5 [2H, s, $-N-CH_2-Ar$]
7,7 [4H, AA' BB', Ar]

c) N-Ethyl-N-methyl-N-stearyl-4-(acetylthio)-benzyl-ammonium-bromid (3)

900 mg der Verbindung 26 (0, 002 Mol) werden in 10 ml Chloroform gelöst und mit 2, 2 g frisch destilliertem Ethylbromid zwei Tage bei 60° C in einem fest verschlossenen Kolben erhitzt. Die quartäre Ammoniumverbindung wird danach mit absolutem Ether ausgefällt und zweimal aus ETOH umkristallisiert.

Ausbeute : 850 mg (76 % d. Th.)
Schmp. : 44 - 46 °C

NMR: ($CDCl_3$) : δ (ppm) = 0,9 [3H, s, CH_3]
1,3 [32H, s, $(-CH_2-)_{16}$]
2 [3H, s, $-N-CH_2-CH_3$]
2,4 [3H, s, Acetyl]
3-4 [7H, m, $-H_2C-N^+(CH_3)-CH_2-$]
5,2 [2H, s, $-N^+-CH_2-Ar$]
7,7 [4H, AA' BB', Ar]

$C_{30}H_{54}OSNBr$ (556, 7) : Ber.: C 64, 69, H 9, 7 N 2, 5
Gef. : C 64, 62 H 9, 81 N 2, 61

2. Bestimmung der Gleichgewichtskonstante der Acetyl-Thiophenol/Imidazolmizelle

Einwaagen: 5, 691 mg Verb. 3 / 500 µl abs. ETOH ($2 \cdot 10^{-2}$ M)
4, 543 mg Verb. 2 / 500 µl abs. ETOH ($2 \cdot 10^{-2}$ M)

Stammlösung :

Die Lösungen der Verbindung 2 und 3 werden unter Ar-Schutzgasatmosphäre gemischt.

Meßlösung : 2950 µl Puffer pH 8,1
20 µl Stammlösung
Verb. 3 : ($7,11 \cdot 10^{-5}$ M)
Verb. 2 : ($7,05 \cdot 10^{-5}$ M)
30 µl DTNB 10^{-4} M
3000 µl

[s]	E	[s]	E
30	0,167	180	0,182
60	0,170	240	0,189
90	0,173	300	0,195
120	0,176		

E zur Zeit t_o = 0,164
Konz. an SH = $1,2 \cdot 10^{-5}$ M

$$K = \frac{7,05 \cdot 10^{-5} \cdot 7,11 \cdot 10^{-5}}{1,2 \cdot 10^{-5} \quad 2} = \frac{50,1}{1,44}$$

K = 34,8

3. Variation der Synthese von N-Stearyl-N, N-dimethyl--N-imidazolyl(4)-methylammoniumchlorid (2)

Eine Lösung von 1,52 g Chlormethylimidazol-hydrochlorid (14) und 2,8 g Dimethylstearylamin (je 0,01 Mol) in 10 ml abs. ETOH wird mit 0,011 Mol $NaOC_2H_5$ in abs. ETOH versetzt und 18 h auf 60 - 80° C erhitzt. Auch eine Verlängerung der Reaktionszeit führte zu keinem quantitativen Umsatz der Ausgangsverbindungen. Dann wird der Reaktionsansatz mit ethanolischer HCl angesäuert und die Lösung bis zur Trockene eingedampft. Mit absolutem Toluol läßt sich aus dem Rückstand nicht umgesetztes Amin als Ammoniumhydrochlorid herauslösen. Das verbleibende Produkt wird in wenig Chloroform gelöst und mit Aceton versetzt. Der Niederschlag wird abfiltriert

und aus dem klaren eingeengten Acetonfiltrat kristallisiert die reine Verbindung aus.

DC : Butanol / Eisessig / H_2O 4 : 1 : 5

Schmp. Lit. [19] : 65° C

Schmp. gef. : 65° C

N, N-Dimethylstearylamin wird nach Leukart-Wallach aus N-Methylstearylamin hergestellt.

4. Kinetikmessungen mit Mizellderivaten

a) Hydrolytische Aktivität der Verbindung 1 gegenüber PNPA

6,99 mg Verbindung 5 werden in 485 µl MeOH gelöst und 15 µl 1 N-NaOH zugespritzt.

Stammlösung: $2,1 \cdot 10^{-2}$ M (= Verbindung 1)

Meßlösung zur SH-Gruppenbestimmung

2950 µl	Puffer pH 8,1
10 µl	CTAB-Lös. $3,3 \cdot 10^{-5}$ M
10 µl	Verb. 1 $7 \cdot 10^{-5}$ M
30 µl	DTNB 10^{-4}
3000 µl	

Eine 10^{-2} molare wäßrige Lösung von Cetyltrimethyl-ammonium-bromid (CTAB) dient als Lösungsvermittler von Verbindung 5.

berechnete E = 0,952

gefundene E = 0,950

≙ einer SH-Konzentration von $7 \cdot 10^{-5}$ M

Meßlösung für die Kinetik

2950 µl	Puffer pH 7,2	
10 µl	CTAB	$3,3 \cdot 10^{-5}$ M
10 µl	Verb. 1	$7 \cdot 10^{-5}$ M
30 µl	PNPA	$1,5 \cdot 10^{-3}$ M
3000 µl		

[min]	E	[min]	E
1	0,389	9	0,560
2	0,477	10	0,653
3	0,511	11	0,562
4	0,525	12	0,563
5	0,535	13	0,564
6	0,544	14	0,567
7	0,550	15	0,568
8	0,556		

b) Hydrolytische Aktivität der Verbindung 2 gegenüber PNPA

9,00 mg der Verbindung 2 werden in 2 ml H_2O gelöst.

Stammlösung: 10^{-2} M

Meßlösung :	2950 µl	Puffer pH 7,2	
	20 µl	Verb. 2	$6,6 \cdot 10^{-5}$ M
	30 µl	PNPA	$1,5 \cdot 10^{-3}$ M
	3000 µl		

[min]	E	[min]	E
1	0,127	9	0,599
2	0,208	10	0,644
3	0,278	11	0,687
4	0,339	12	0,733
5	0,396	13	0,776
6	0,451	14	0,821
7	0,502	15	0,864
8	0,549		

$$v = \frac{0,044}{10700} = 4,1 \cdot 10^{-6} \text{ Mol } \text{min}^{-1}$$

$$WZ = \frac{4,1 \cdot 10^{-6}}{6,6 \cdot 10^{-5}} = 6,2 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

c) Hydrolytische Aktivität der Mischmizelle aus Verbindung 1 und 2 gegenüber PNPA

Meßlösung:			
	2930 µl	Puffer pH 7,2	
	10 µl	CTAB	$3,3 \cdot 10^{-5}$ M
	10 µl	Verb. 1	$7 \cdot 10^{-5}$ M
	20 µl	Verb. 2	$6,6 \cdot 10^{-5}$ M
	30 µl	PNPA	$1,5 \cdot 10^{-3}$ M
	3000 µl		

[min]	E	[min]	E
1	0,492	9	1,224
2	0,679	10	1,286
3	0,797	11	1,346
4	0,888	12	1,403
5	0,970	13	1,457
6	1,039	14	1,510
7	1,101	15	1,562
8	1,162		

$$v = \frac{0,053}{10700} = 4,9 \cdot 10^{-6} \text{ Mol min}^{-1}$$

$$WZ = \frac{4,9 \cdot 10^{-6}}{7 \cdot 10^{-5}} = 7 \cdot 10^{-2} \text{ min}^{-1}$$

Literaturverzeichnis

1. D. M. Blow, Accounts of Chem. Research 9, 145 (1976)
2. I. M. Klotz, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 69, 2155 (1972)
3. C. G. Overberger und T. W. Smith, Macromolecules 8, 407 (1975)
4. M. L. Bender und B. W. Turnquest, J. Am. Chem. Soc. 79, 1656 (1956)
5. T. Kunitake, S. Shinkai und S. Hirotsu, J. Org. Chem. 42, 306 (1977)
6. F. Shimidzu, A. Furuta und Y. Nakamoto, Macromolecules 7, 160 (1974)
7. Y. Birk und I. M. Klotz, Bioorg. Chem. 1, 275 (1971)
8. F. Schneider, Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 348, 1034 (1967)
9. D. J. Hupe und W. P. Jencks, J. Am. Chem. Soc. 99, 451 (1977)
10. Dissertation G. Waldheim, Univ. Kiel (1977)
11. P. F. Wiley, J. Org. Chem. 16, 812 (1951)
12. G. L. Ellman, Arch. Biochem. Biophys. 82, 70 (1959)
13. W. L. Zahler und W. W. Cleland, J. Biol. Chem. 243, 716 (1968)
14. R. Weidenhagen und R. Herrmann und H. Wegner, Chem. Ber. 70, 570 (1937)
15. W. J. Darby und J. R. Totter, Org. Synth. Coll. Vol. 3, 460
16. R. Turner, F. Huebner und R. Scholz, J. Am. Chem. Soc. 71, 2802 (1949)
17. D. J. Dawson, R. D. Gless und R. E. Wingard Jr., J. Am. Chem. Soc. 98, 5996 (1976)
18. M. F. Bodroux, Bull. Soc. Chem. Fr. 33, 831 (1905)
19. W. Tagaki, M. Chigira, T. Amada und Y. Yano, J. Chem. Soc. Chem. Commun. 219 (1972)
20. M. J. Heller, J. A. Walder und I. M. Klotz, J. Am. Chem. Soc. 99, 2780 (1977)
21. Campaigne und Meyer, J. Org. Chem. 27, 2835 (1962)
22. F. G. Bordwell und P. J. Boutan, J. Am. Chem. Soc. 78, 854-60 (1956)
23. A. Roedig in Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller) Bd. 4/5, S. 597, Thieme, Stuttgart 1960

TEIL II:

Inhaltsverzeichnis

THEORETISCHER TEIL

	Seite
A. Einleitung und Problemstellung	88
B. Struktur der verwendeten optisch aktiven Adsorbentien	91
C. Verbesserung der chromatographischen Trennmethode und der Versuchsauswertung	94
I. Ersatz des Benzols durch Toluol	94
II. Geschlossenes System (Niederdruck)	97
III. Versuchsaufbau und graphische Auswertung	97
1. Versuchsaufbau	97
2. Auswertung	100
D. Racemattrennungen an Polyamiden	107
I. Synthese und Trennprinzip der Polyamidadsorbentien	107
1. Synthese	107
2. Trennprinzip	107
II. Trennung chiraler Pharmaka	108
1. 4-Methyl-1,4-diphenyl-3,5-pyrazolidindion	108
2. Phenprocoumon	110
3. Biglumid	110
a) Isolierung	111
b) Racemisierungskinetik	112
c) Exobiglumid	113

Seite

4. Chlorthalidon 114
   a) Isolierung 114
   b) Racemisierungskinetik 116
   c) Chlorthalidonmethylether 121

5. Oxazepam 122
   a) Isolierung 122
   b) Bestimmung der absoluten Konfiguration 125

6. Camazepam 126

E. Prüfung der Anwendungsbreite von Cellulosetriacetat und Vergleich mit den Polyamidadsorbentien 127

I. Synthese und Trennprinzip des Cellulosetriacetates 127
   1. Synthese 127
   2. Trennprinzip 127

II. Chromatographie von Modellsubstanzen 130
   1. α-substituierte Phenylacetamide 131
   2. N-Benzoylaminosäureethylester 135
   3. Substituierte Acetamide 137
   4. Cyanessigsäureamide 138
   5. Carbonsäuren 141
   6. Benzoinderivate 142

III. Chromatographie von Arzneistoffen und Arzneistoffvorstufen 143
   1. Piperidindione 144
   2. Hydantoine 146
   3. Succinimide 147
   4. Barbiturate 149
   5. Cyanessigsäuremethylester 167
   6. Weitere Pharmaka 171

Seite

IV. Struktur und resultierende Anreicherung 174

F. Technische Weiterentwicklung der chromatographischen Trennmethode 176

I. Recyclingchromatographie 176

1. Vollständige Trennung von Mandelamid 176

2. Isolierung des (-)-Antipoden eines Thalidomidanalogons 177

II. Trennung von Mandelamid durch Hochdruckflüssigkeits-chromatographie 178

G. Zusammenfassung 180

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Allgemeine Methoden 185

II. Trennung an Polyamiden 189

1. N-Benzoyltyrosinethylester 189

2. Thalidomid 191

3. 4-Methyl-1,4-diphenyl-3,5-pyrazolidindion 192

4. Phenprocoumon 194

5. Biglumid 195

a) Isolierung der Enantiomeren 195

b) Racemisierungskinetik 197

c) Synthese von Exobiglumid 198

d) Vergleichende Chromatographie Endo-Exobiglumid 199

Seite

6. Chlorthalidon 201
   a) Isolierung der Enantiomeren 201
   b) Racemisierungskinetik bei verschiedenen pH-Werten 203
   c) Synthese von Chlorthalidonmethylether 207
   d) Chromatographie des Chlorthalidonmethylethers 208

7. Oxazepam 210
   a) Isolierung der Enantiomeren 210
   b) Bestimmung der absoluten Konfiguration 212

8. Camazepam 213

9. Phenylethylcyanessigsäureamid 213

III. Trennung an Cellulosetriacetat 214
1. Synthese von Cellulosetriacetat 214
2. Trögersche Base 215
3. α-substituierte Phenylacetamide 216
   a) Mandelamid 216
   b) O-Methylmandelamid 217
   c) O-Acetylmandelamid 218
   d) Tropasäureamid 219
   e) Atrolactinsäureamid 220

4. N-Benzoylaminosäureester 221
   a) N-Benzoylphenylglycinethylester 221
   b) N-Benzoylphenylalaninethylester 222
   c) N-Benzoyltyrosinethylester 223

5. Substituierte Acetamide 224
   a) N-Acetylphenylethylamin 224
   b) N-Acetyl-1-phenyl-2-methyl-propylamin 225
   c) N-Acetyl-α-cyan-benzylamin 226

Seite

6. Cyanessigsäureamide 227
   a) Phenylethylcyanessigsäureamid 227
   b) Cyclohexenylmethylcyanessigsäureamid 228

7. Carbonsäuren 229
   Phenylethylcyanessigsäure 229

8. Benzoinderivate 230
   a) Benzoin 230
   b) O-Methylbenzoin 231
   c) O-Acetylbenzoin 232

9. Piperidindione 233
   a) Glutethimid 233
   b) Methyprylon 234

10. Hydantoine 235
    Mephenytoin 235

11. Succinimide 236
    a) Mesuximid 236
    b) Ethosuximid 238

12. Barbiturate 239
    a) Methylphenobarbital 239
    b) Hexobarbital 240
    c) Methyleudan 241
    d) 1-Methyl-5,5-phenylpropylbarbitursäure 242
    e) Methylcyclobarbital 243
    f) 1,5-Dimethyl-5-cyclohexylbarbitursäure 244
    g) 1-Methyl-5,5-cyclohexylethylbarbitursäure 245
    h) 1-Methyl-5,5-cyclopentenylethylbarbitursäure 246
    i) 1-Methyl-5,5-ethylpropylbarbitursäure 247
    j) Vinylbital 247

Seite

13. Cyanessigsäuremethylester 248
a) Phenylmethylcyanessigsäuremethylester 248
b) Phenylethylcyanessigsäuremethylester 249
c) Phenylbutylcyanessigsäuremethylester 250

14. Weitere Pharmaka 251
a) Chloroquin 251
b) Phenprocoumon 251
c) Atropin 252
d) Phenylpropanol 253

IV. Recyclingchromatographie und HPLC 254

1. Quantitative Trennung von Mandelamid 254
2. Isolierung des (-)-Antipoden eines Thalidomidanalogons 258
3. HPLC-Chromatographie von Mandelamid 260

Literaturverzeichnis 261

A. Einleitung und Problemstellung

Enantiomere unterscheiden sich oft charakteristisch in ihren pharmakologischen und physiologischen Eigenschaften. Trotz dieser bekannten Tatsache werden Arzneistoffe meist als Racemate getestet, da ihre Herstellung in optisch aktiver Form nach den bisherigen Methoden oft zu umständlich oder überhaupt nicht möglich ist.

Eine Racematspaltung durch fraktionierte Kristallisation diastereomerer Salze erfordert geeignete funktionelle Gruppen. Sie ist auf Carbonsäuren und Amine beschränkt. Die Zerlegung chiraler Substanzen durch Mikroorganismen und Enzyme ist verlustreich und bei kleinen Substanzmengen sowie leicht racemisierenden Verbindungen nicht anwendbar. Racemattrennungen durch Kristallisation von Einschlußverbindungen führen nur zu sehr geringen Aktivierungen. Die Chromatographie an optisch aktiven Adsorbentien ist eine weitere Methode zur Trennung von Racematen in die optisch reinen Antipoden.

Seit zu Beginn dieses Jahrhunderts auf die Möglichkeit einer chromatographischen Racemattrennung hingewiesen wurde [1], sind zahlreiche Versuche unternommen worden, geeignete optisch aktive Adsorbentien zu suchen. Dennoch waren bis vor kurzem die vielen Trennversuche, in etwa 400 Veröffentlichungen beschrieben, nur in Ausnahmefällen erfolgreich.

Ein bekanntes Beispiel stellt die Aktivierung der Trögerschen Base dar, die wegen ihrer Säureempfindlichkeit mit anderen Methoden nicht spaltbar ist. Prelog und Wieland [2] konnten bei der Chromatographie dieses Racemats an d-Lactosehydrat eine 5 %ige optische Anreicherung erzielen.

1975 gelang Cram [3] die Auftrennung chiraler Ammoniumverbindungen an optisch aktiven Kronenethern, die kovalent an vernetztes Polystyrol gebunden waren. Diese Methode scheint jedoch wie die Liganden-Austausch-Chromatographie [4] und die Trennung an optisch aktiven Ionenaustauschern auf wenige, auch konventionell gut trennbare Racemate beschränkt zu sein. Ebenfalls ist die Racemattrennung über chirale charge-transfer Acceptoren wie die

2-(2,4,5,7-Tetranitro-9-fluorenylidenaminooxy)-propionsäure, die adsorptiv an Kieselgel gebunden war, offenbar nur für Helicene geeignet [5]. Weitere Trennungen sind an den Naturstoffen Stärke [6,7] und Cellulose [8] sowie gaschromatographisch an optisch aktiven stationären Phasen beschrieben worden [9].

Blaschke [10] und Mitarbeitern gelang die Verwirklichung des chromatographischen Trennprinzips an verschiedenen synthetischen Polyamiden, die aus optisch aktiven Monomeren aufgebaut worden waren. Unter Verwendung der beiden enantiomerenspezifisch doppelmarkierten Testracemate Mandelsäure und Mandelamid wurde eine Reihe Polymerer im Mikromaßstab untersucht. Die wirksamsten Adsorbentien wurden durch Variation der Herstellungsbedingungen soweit optimiert, daß sie beide Testracemate vollständig trennten.

Schwanghart [11] und Kraft [12] hatten schließlich auch Versuche im präparativen Maßstab an solchen Polyamiden unternommen. Hierbei wurden chirale Pharmaka besonders berücksichtigt. So gelang beispielsweise die quantitative säulenchromatographische Aufspaltung des Thalidomids [12].

Das von Hesse und Hagel [13] eingeführte mikrokristalline Cellulosetriacetat ist ein neues Adsorbens, das in vielen Fällen erstaunlich gute Trennungen ergibt. Chirale Verbindungen aus verschiedenen Substanzklassen werden in der Regel aktiviert, teilweise sogar quantitativ getrennt.

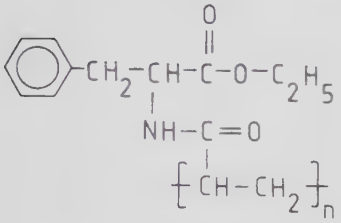
Ziele dieser Arbeit

Zunächst sollte die Methodik der Chromatographieversuche verbessert werden, um unter Einsatz moderner Geräte sicherer arbeiten zu können und eine schnellere Versuchsdurchführung und Auswertung zu ermöglichen. Nach Abschluß dieser Vorarbeiten beabsichtigte man konventionell nicht trennbare Arzneistoffe an Polyamidadsorbentien zu chromatographieren und so reine Antipoden zu isolieren.

Eine weitere Aufgabe war die Herstellung des Cellulosetriacetats. Alle bereits an Polyamidgelen untersuchten Testracemate sollten ebenfalls an der Triacetylcellulose chromatographiert werden. Die Trennleistung beider Adsorbentientypen sollte verglichen werden.

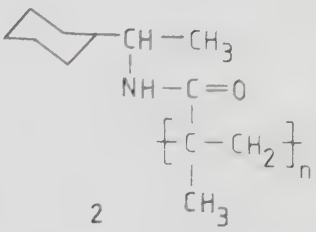
B. Struktur der verwendeten optisch aktiven Adsorbentien

Die Chromatographieversuche der vorliegenden Arbeit wurden an den optisch aktiven Adsorbentien folgender Struktur durchgeführt:



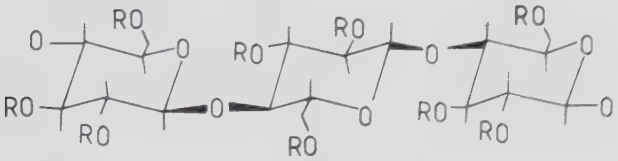
1

Poly [(S)-N-1-(1-ethoxycarbonyl--2-phenylethyl) acrylamid]



2

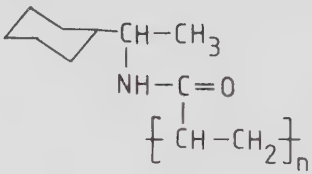
Poly [(S)-N-(1-cyclohexylethyl)-methacrylamid]



R = Acetyl 3

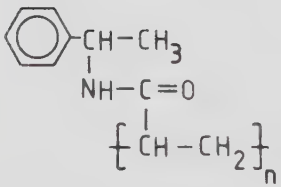
mikrokristallines Cellulosetriacetat

Zur Diskussion werden die Trennergebnisse an den synthetischen Polyamiden 4 - 6 herangezogen:



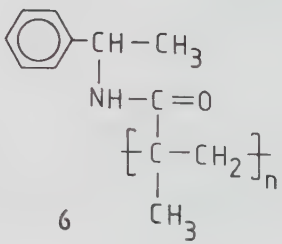
4

Poly [(S)-N-(1-cyclohexylethyl) acrylamid]



5

Poly [(S)-N-(1-phenylethyl)-acrylamid]



6

Poly [(S)-N-(1-phenylethyl)-methacrylamid]

Die Adsorbentien 1, 4 und 5 stellen substituierte vernetzte Polyacrylamide dar, die sich in ihren chiralen Resten unterscheiden. Identische Seitenketten, aber chemisch verschiedene Grundgerüste besitzen die Polymeren 2 und 4 sowie 5 und 6.

Von diesen Adsorbentien unterscheiden sich 1 und 2 in ihrer Struktur am stärksten. Entsprechend waren bei früheren Versuchen die Unterschiede ihrer Trennwirkung gegenüber verschiedenen Racematen besonders ausgeprägt [11, 12]. Daher beschränkte man sich auf die Chromatographie an diesen beiden Säulen.

C. Verbesserung der chromatographischen Trennmethode und der Versuchsauswertung

Alle bisher in der Arbeitsgruppe durchgeführten Chromatographieversuche waren an langen offenen Säulen mit dem Standardfließmittel Benzol durchgeführt worden. Wurde die Substanz mit Benzol zu langsam eluiert, verwendete man stärker polare Benzol/Dioxangemische. Bei zu rascher Elution wurde dem Benzol Cyclohexan zugesetzt. Chromatographie unter Druck war in diesem System nicht möglich. Die Fließgeschwindigkeit mußte durch Variation des hydrostatischen Drucks reguliert werden, wobei nur ein geringer Überdruck erzielbar war. Da dieser Versuchsaufbau viel Raum beanspruchte, um eine ausreichende Fließgeschwindigkeit zu ermöglichen, konnte trotz toxischer Elutionsmittel nicht im Abzug gearbeitet werden.

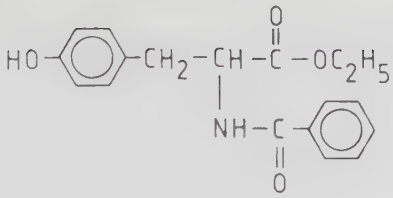
Folgende Veränderungen und Ergänzungen wurden nun zur Verbesserung der Arbeitsbedingungen, zur Versuchsbeschleunigung und zur Erzielung besserer Trennungen durchgeführt.

I. Ersatz des Benzols durch Toluol

Es sollte geprüft werden, ob der heute in der Chromatographie übliche Ersatz des toxischen Benzols durch Toluol auch bei Versuchen an Polyacrylamiden möglich ist. Toluol wird vom Organismus zu Benzoesäure metabolisiert und bildet keine karzinogenen Oxiranringe wie Benzol. Vorversuche zeigten, daß die Perlpolymerisate 1 und 2 in Toluol mit gleicher Volumenvergrößerung wie in Benzol zu durchscheinenden Gelen quollen.

Quellfaktor für 1 : 3,8 in Toluol, 3,7 in Benzol
Quellfaktor für 2 : 3,6 in Toluol, 3,6 in Benzol

Damit erschien ein Vergleich der Trennleistung sinnvoll. Es wurde N-Benzoyltyrosinethylester an Adsorbens 2 im Toluol : Dioxan - Gemisch chromatographiert.



7

N-Benzoyltyrosinethylester

Die Substanz war im Fließmittel Benzol : Dioxan 8 : 2 zu 80, 7 % aktiviert worden und stellte bislang das beste Ergebnis dar, das an Polyamiden mit einem Testracemat im präparativen Maßstab erzielt wurde [12]. Unter Einhaltung aller übrigen Chromatographieparameter wie Menge des Adsorbens, Säulenmaße sowie Fließgeschwindigkeit wurde in Toluol : Dioxan 8 : 2 eine Verbesserung der optischen Ausbeute auf 89, 8 % erreicht (Abb. 1).

Der Versuch zeigt, daß Benzol als Elutionsmittel durch Toluol austauschbar ist. Der Ersatz des Benzols durch Toluol führte auch in allen anderen überprüften Fällen zu praktisch gleichen Ergebnissen.

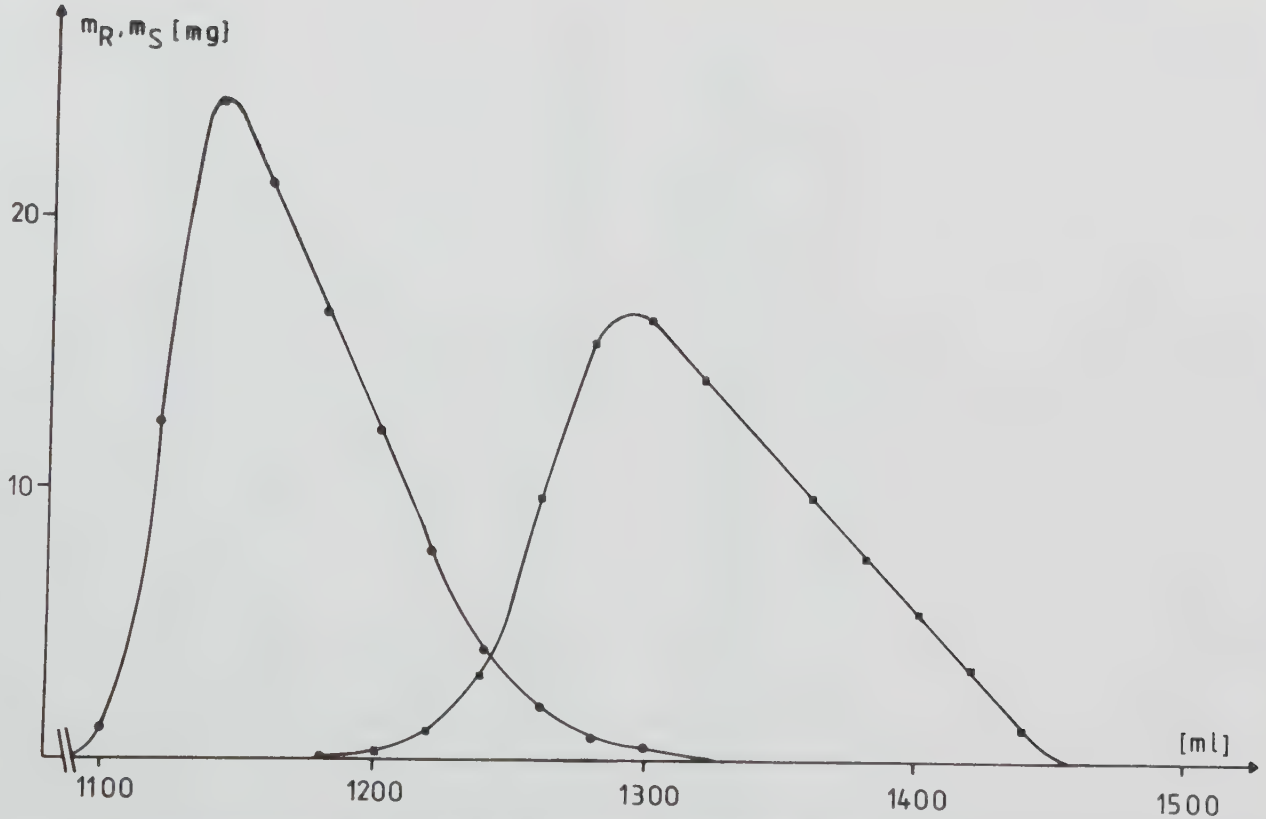
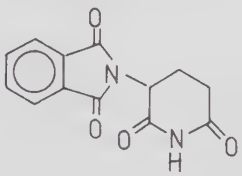


Abb. 1 : Chromatographie von 199, 7 mg (R, S)-N-Benzoyltyrosinethylester (7) an 65 g Polyamid 2 (62 x 2, 5 cm)
Elutionsmittel : Toluol/Dioxan 8 : 2

II. Geschlossenes System (Niederdruck)

Um an einer völlig geschlossenen Apparatur chromatographieren zu können, mußte das Fließmittel durch das Adsorbens gepumpt werden. Es sollte zunächst untersucht werden, ob sich auch Polyamidgele zur Niederdruckchromatographie eignen. Von den bisher an Polyamiden untersuchten Racematen war Thalidomid am besten getrennt worden [12].



8

Thalidomid (Contergan^{R})

Es wurde jetzt an Adsorbens 2 unter Verwendung von 2,5 bar Druck in Toluol/Dioxan 8:2 chromatographiert. Auch bei der höheren Fließgeschwindigkeit (50 ml/h gegenüber 12 ml/h) erhielt man eine quantitative Racemattrennung. Die Dauer des Versuches reduzierte sich von 39 auf 11 Stunden. Bei höherem Druck über 4 bar nimmt die Durchflußgeschwindigkeit des hier verwendeten gröber strukturierten Materials wieder ab, da das Gelbett reversibel komprimiert wird.

III. Versuchsaufbau und graphische Versuchsauswertung

1. Versuchsaufbau

Alle folgenden Chromatographieversuche wurden in einem geschlossenen System durchgeführt. Die Fließgeschwindigkeit wurde durch Druck geregelt. Die verwendete Versuchsapparatur zeigt Abbildung 2.

Die Probe wurde unter Druck mit Hilfe eines 6-Wege-Drehventils aufgetragen. Das Eluat der thermostatisierbaren Säule wurde in die Durchflußküvette eines UV-Spektralphotometers oder bei Gebrauch aromatischer Lösungsmittel eines Differentialrefraktometers und anschließend in die Durchflußküvette eines Polarimeters geleitet und schließlich in einem Fraktionssammler aufgefangen. Ein Zwei-Kanalschreiber registrierte kontinuierlich Drehwert und Substanzkonzentration. Der Schreiber war zudem mit dem Fraktionssammler verbunden, wobei ein Marker den jeweiligen Fraktionswechsel aufzeichnete.

Dieser Versuchsaufbau ermöglicht auch die Durchführung einer Recyclingchromatographie und die Abnahme von hochangereicherten Fraktionen aus dem Kreislauf ("Peakshaving"). Durch die technischen Erweiterungen können bei Racematen, die nach einmaligem Durchlauf nur angetrennt werden, rationell die reinen Antipoden gewonnen werden. Zwei Beispiele dieser Arbeitsmethode sind in Kapitel F beschrieben.

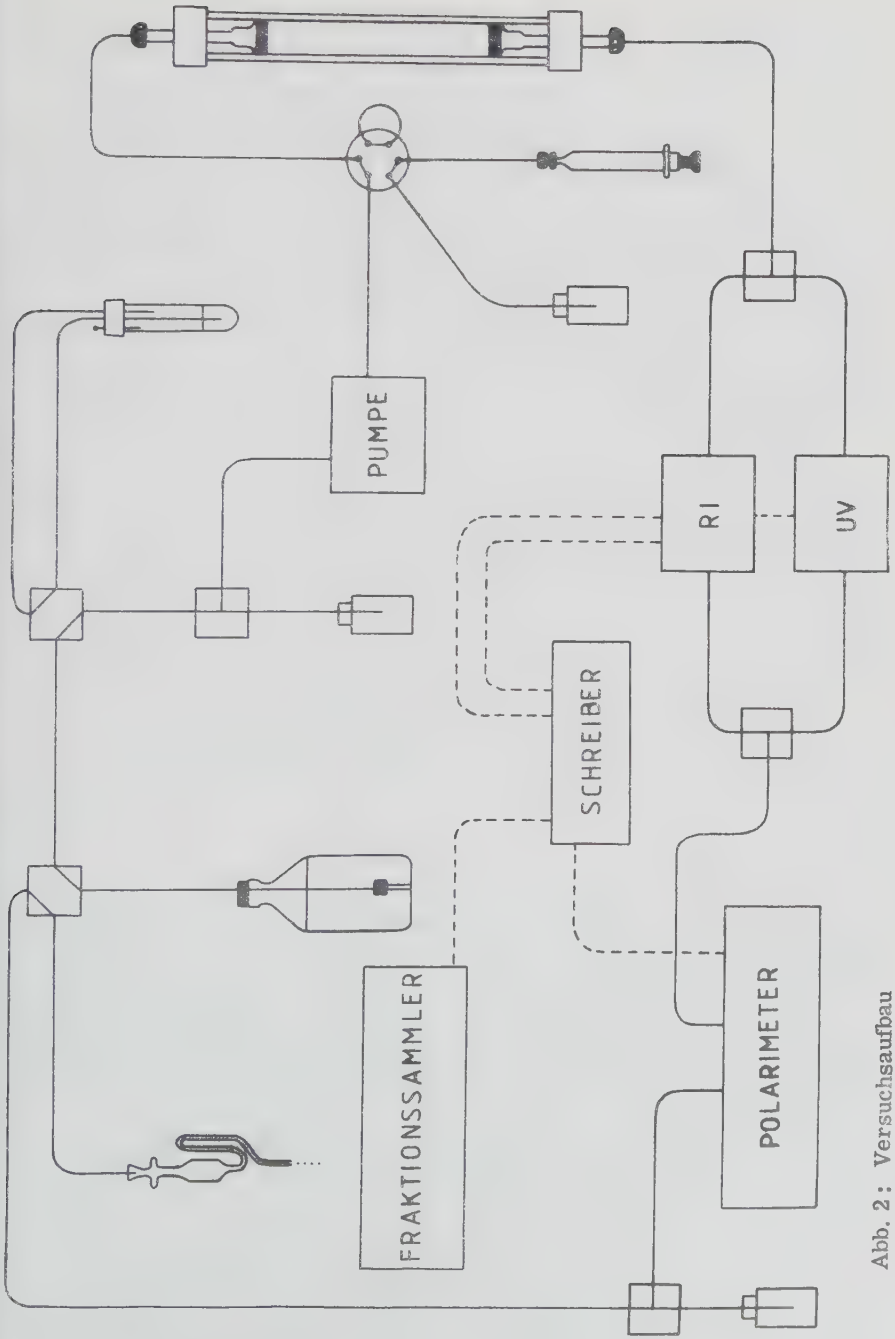


Abb. 2: Versuchsaufbau

2. Auswertung

Die Schreiberdiagramme ermöglichen die Berechnung der Substanzmenge aus UV- oder Refraktometerkurve sowie des Drehwertes der jeweiligen Fraktion und somit die optische Ausbeute als Maß für die Trennleistung. Durch die graphische Versuchsauswertung wurde eine erhebliche Beschleunigung des Arbeitsprozesses erreicht. In früheren Versuchen wurde jede Fraktion einzeln abgedampft, die Abdampfrückstände gewogen und der jeweilige Drehwert durch statische Messung ermittelt. Da ein Chromatographieversuch etwa 25 Fraktionen umfaßt, mußten diese Arbeitsgänge ebensooft wiederholt werden.

a) Berechnung der Substanzmenge M pro x ml Fraktion

Der Eichfaktor s für die Masse M wird bestimmt aus den Eichfaktoren für das Volumen s_v und für die Konzentration s_c.

s_c wird bestimmt durch Abeichung der Ordinate des Schreiberpapiers (Skalenteile Extinktion oder Refraktion gegen Konzentration).

s_v wird bestimmt durch Abeichung der Abzisse des Schreiberpapiers (Zentimeter gegen Eluatvolumen).

$$s = s_c \cdot s_v \qquad \text{(Gleichung 1)}$$

Als Fraktion wird die Distanz zwischen zwei Zentimeterstrichen der Abzisse gewählt.

Von einer Basislinie ausgehend wird die Höhe der Kurve bei Fraktionsbeginn a_M und bei Fraktionsende b_M abgelesen. und die Substanzmenge pro Fraktion berechnet.

$$a_M > b_M \qquad M = \left(b_M + \frac{a_M - b_M}{2} \right) \cdot s \ [mg] \qquad \text{(Gleichung 2 a)}$$

$$a_M < b_M \qquad M = \left(a_M + \frac{b_M - a_M}{2} \right) \cdot s \ [mg] \qquad \text{(Gleichung 2 b)}$$

b) Berechnung des Drehwinkels α pro x ml Fraktion

Nach Gleichung 3a und 3b verläuft die Berechnung des Drehwinkels α für jede Fraktion. Es werden die Skalenteile a_α und b_α bei Beginn bzw. Ende jeder Fraktion abgelesen und daraus mit Hilfe von K die Drehwerte berechnet. Die Konstante K ist von der Empfindlichkeitseinstellung des Polarimeters abhängig.

$$a_\alpha > b_\alpha \qquad \alpha = \left(b_\alpha + \frac{a_\alpha - b_\alpha}{2} \right) \cdot K \qquad \text{(Gleichung 3 a)}$$

$$a_\alpha < b_\alpha \qquad \alpha = \left(a_\alpha + \frac{b_\alpha - a_\alpha}{2} \right) \cdot K \qquad \text{(Gleichung 3 b)}$$

Für den spezifischen Drehwert $[\alpha]$ der jeweiligen Fraktion in x ml gilt Gleichung 4

$$[\alpha] = \frac{\alpha \cdot 1000 \cdot x}{(m_R + m_S)} \qquad \text{(Gleichung 4)}$$

m_R bzw. m_S = Gewichtsmenge des (R)- bzw. (S)-Enantiomeren [mg]

Bei bekanntem spezifischen Drehwert $[\alpha]_{o.r.}$ des optisch reinen Enantiomeren erhält man einerseits nach Gleichung 5 die prozentuale optische Ausbeute der einzelnen Fraktionen Ai, andererseits die Gewichtsmengen der Enantiomeren m_R und m_S gemäß Gleichung 6.

$$Ai = \frac{[\alpha] \cdot 100}{[\alpha] o.r.} \ \% \qquad \text{(Gleichung 5)}$$

$$m_R \text{ bzw. } m_S = \frac{1}{2}\left[(m_R + m_S) \pm \frac{\alpha \cdot 1000 \cdot x}{[\alpha]_{o.r.}} \right] \quad \text{(Gleichung 6)}$$

$$m_R = (m_R + m_S) - m_S \text{ bzw. } m_S = (m_R + m_S) - m_R$$

Vorzeichen + bei positiven, - bei negativen Drehwerten

Die Berechnung der optischen Gesamtausbeute Ag erfolgt nach Gleichung 7

$$Ag = \frac{\sum [Ai \cdot (m_R + m_S)]}{\sum [(m_R + m_S)]} \quad \text{(Gleichung 7)}$$

Die Gesamtaktivierung Ag stellt das wichtigste Kriterium für die Beurteilung der Trenneigenschaften der Adsorbentien dar.

Zur Charakterisierung quantitativ verlaufender Racematspaltungen (Ag = 100 %) werden in dieser Arbeit weitere chromatographische Kenngrößen herangezogen.

Der Trennfaktor α [14] wird nach Gleichung 8 ermittelt

$$\text{Trennfaktor } \alpha = \frac{t_{R_2} - t_o}{t_{R_1} - t_o} \quad \text{(Gleichung 8)}$$

t_{R_1} = Retentionszeit des zuerst eluierten Enantiomeren

t_{R_2} = Retentionszeit des zuletzt eluierten Enantiomeren

t_o = Retentionszeit einer nicht zurückgehaltenen Substanz

Der Trennfaktor α ist ein Maß für die relative Retention. Ist der Trennfaktor $\alpha = 1$, so ist kein Trenneffekt vorhanden.

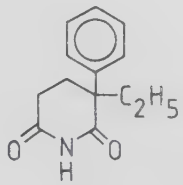
Für die Auflösung R_S [14] einer Chromatographie gilt Gleichung 9

$$R_S = 2\left(\frac{t_{R_2} - t_{R_1}}{w_1 + w_2}\right) \qquad \text{(Gleichung 9)}$$

w_1, w_2 = Basisbreiten der Elutionskurven, die durch Anlegen der Tangenten an die Schenkel der Kurven erhalten werden.

Auch R_S ist ein Maß für den Grad der Trennung. Die Trennung zweier Enantiomeren ist umso besser, je größer R_S ist. Voraussetzung für die Berechnung sind annähernd symmetrische Elutionskurven.

Als Beispiel einer Versuchsdurchführung nach Abbildung 2 und der graphischen Auswertmethode ist die Chromatographie von 210,9 mg des Hypnoticums Glutethimid (Doriden®) an mikrokristallinem Cellulosetriacetat aufgeführt.



9

Glutethimid (Doriden®)

Das Drehwert/Massendiagramm zeigt Abbildung 3

Die Aufspaltung der UV-Kurve in zwei erkennbare Peaks deutet bereits auf eine gute Aktivierung dieses Racemates hin. Die Gesamtausbeute Ag betrug 86,7 %. Da die Acetylcellulose im Elutionsmittel Ethanol eine gewisse Löslichkeit besitzt (100 mg/l bei 25° C), bietet sich die spektroskopische Massenbestimmung für dieses Adsorbens als Methode der Wahl an.

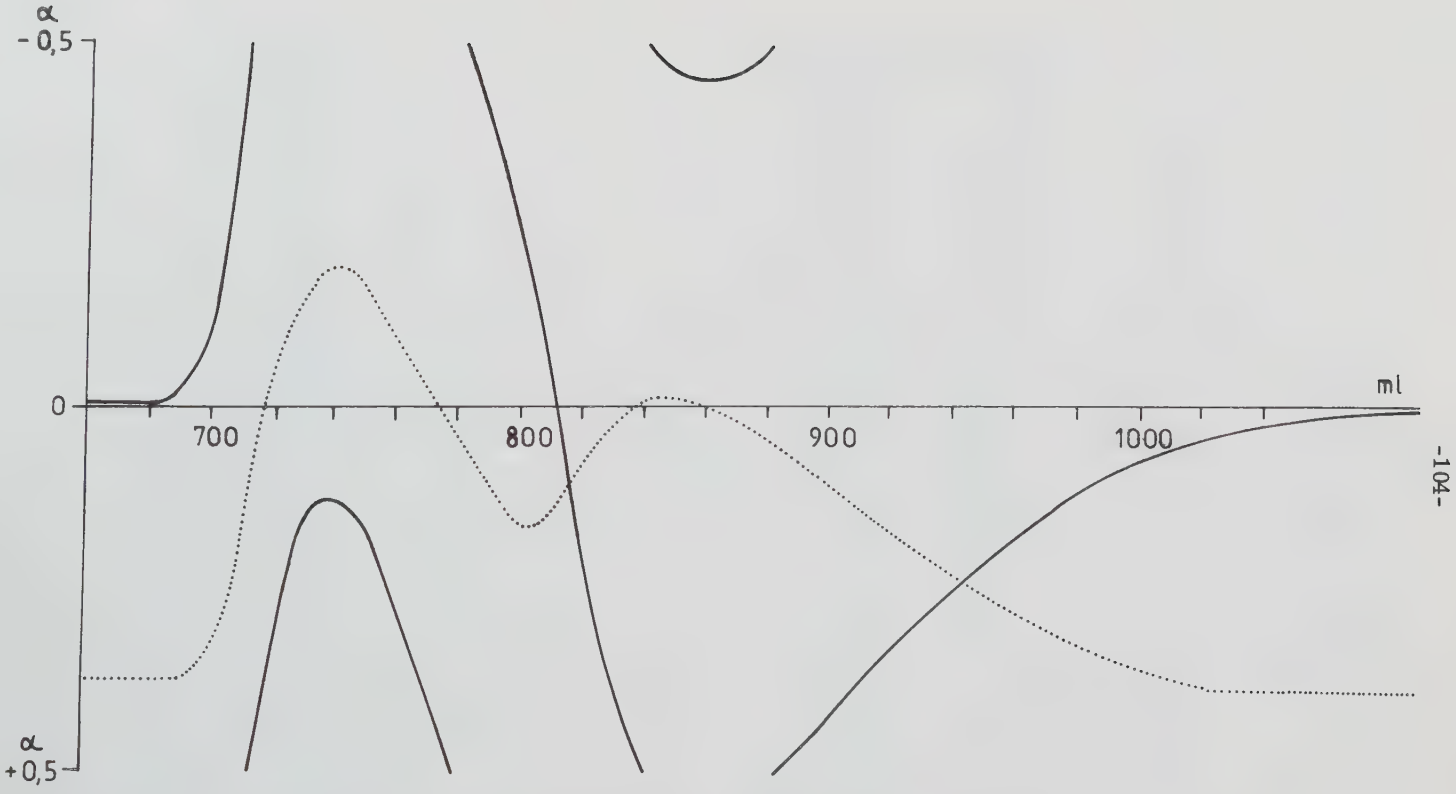


Abb. 3 : Chromatographie von 210, 9 mg Glutethimid (9) an 205 g Cellulosetriacetat (85 x 2, 5 cm)
Elutionsmittel : 95 % ETOH
Drehwert/Massendiagramm, —— Drehwertkurve, ------ UV-Kurve

Tabelle 1 : Analytische Racemattrennung von 210, 9 mg Glutethimid (Doriden ^{R}) an 205, 0 g Cellulosetriacetat

(S)-Enantiomer: $_{365}$ = - 625,8° (MeOH) [12]

$_{365}$ = - 638,3° (ETOH 95 %)

1 Skt = 0, 06 mg/ml

1 cm = 12, 4 ml

s = 0, 75

Frakt.-Nr.	ES UV 257,5	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_R	m_S	Ai %
-	0	0	-	0	0	-
1	4, 9	- 0, 270	- 683, 3	0	4, 9	100
2	11, 6	- 0, 596	- 637, 1	0	11, 6	100
3	16, 1	- 0, 804	- 619, 2	0, 2	15, 9	97
4	17, 1	- 0, 837	- 607	0, 4	16, 7	95, 1
5	15, 8	- 0, 762	- 598	0, 5	15, 3	93, 7
6	13, 2	- 0, 633	- 594, 6	0, 5	12, 7	93, 2
7	10, 4	- 0, 496	- 591, 4	0, 4	10	92, 7
8	8	- 0, 353	- 547, 2	0, 6	7, 4	85, 7
9	7, 2	- 0, 141	- 242, 8	2, 3	4, 9	38
10	8, 8	+ 0, 146	+ 205, 7	5, 8	3	32, 2
11	11	+ 0, 353	+ 398	8, 9	2, 1	62, 4
12	12	+ 0, 485	+ 501, 2	10, 7	1, 3	78, 5
13	12, 2	+ 0, 534	+ 542, 8	11, 3	0, 9	85
14	11, 6	+ 0, 529	+ 565, 5	10, 9	0, 7	88, 6
15	10, 6	+ 0, 494	+ 577, 9	10	0, 6	90, 5
16	9, 5	+ 0, 447	+ 583, 5	9, 1	0, 4	91, 4
17	8, 2	+ 0, 395	+ 597, 3	7, 9	0, 3	93, 6
18	7	+ 0, 339	+ 600, 5	6, 8	0, 2	94, 1
19	5, 8	+ 0, 285	+ 609, 3	5, 6	0, 2	95, 5
20	4, 7	+ 0, 236	+ 622, 6	4, 6	0, 1	97, 5

Frakt. Nr.	ES UV 257,5	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_R	m_S	Ai %
21	3,8	+ 0,191	+ 623,3	3,7	0,1	97,7
22	1,9	+ 0,151	+ 645,6	2,9	0	100
23	2,2	+ 0,118	+ 665	2,2	0	100
24	0,0	0,0	-	0	0	-
Sa.:	214,6				Ag:	86,7

ES : eluierte Substanzmenge [mg]

α_{nm} : abgelesener Drehwert

$[\alpha]_{nm}$: spezifischer Drehwert

m_R, m_S : Gewichtsmenge des (R)- bzw. (S)-Enantiomers [mg]

Ai : optische Ausbeute der einzelnen Fraktion

Ag : optische Gesamtausbeute über alle Fraktionen

D. Racemattrennungen an Polyamiden

I. Synthese und Trennprinzip der Polyamidadsorbentien

1. Synthese

Die monomeren Synthesevorstufen von 1 und 2 waren durch Umsetzung von (S)-Phenylalaninethylester mit Acrylsäureanhydrid beziehungsweise (1)-1--Cyclohexylethylamin mit Methacrylsäureanhydrid hergestellt worden. Durch radikalische Suspensionspolymerisation mit Ethandiol-diacrylat als Vernetzer hatte man die Adsorbentien 1 und 2 als weiße Perlpolymerisate erhalten [11, 12].

2. Trennprinzip

Bei chromatographischer Racematspaltung entstehen durch reversible Adsorption der Enantiomeren des Racemates an das optisch aktive Adsorbens diastereomere Komplexe. Die unterschiedliche Stabilität dieser Komplexe ergibt eine unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit der Antipoden in der Säule und damit die Trennung.

Bei der radikalischen Polymerisation der Acryl- und Methacrylamide mit voluminösen Substituenten entstehen vermutlich geordnete Bereiche mit vorwiegend syndiotaktischer Anordnung. Durch Wasserstoffbrückenbindung zwischen benachbarten Amidfunktionen könnte, ähnlich wie bei Peptiden, eine Helixstruktur entstehen. Im Inneren liegt die Polymerkette mit den adsorptiv wirksamen Amidgruppen, die optisch aktiven Substituenten weisen nach außen. Zwischen diesen raumerfüllenden Resten bilden sich asymmetrische Hohlräume aus, in welche die Enantiomeren durch Umwandlung einer intramolekularen in eine oder mehrere intermolekulare Wasserstoffbrückenbindungen hineingezogen werden. Die bessere Einpassung eines der beiden Isomeren bewirkt die unterschiedliche Stabilität dieser diastereomeren Komplexe und bestimmt damit die Verweildauer der Enantiomeren in den Adsorbensnischen.

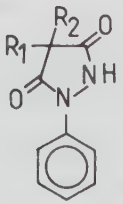
Aus diesen Ableitungen ergibt sich, daß ein Racemat notwendigerweise über funktionelle Gruppen mit Wasserstoffdonator- und Acceptoreigenschaften verfügen muß, um an Polyamidadsorbentien aktiviert werden zu können. Als besonders geeignete Strukturen sind bisher Amid- und Imidfunktionen erkannt worden.

II. Trennung chiraler Pharmaka

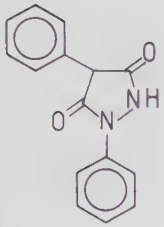
Da eine Racemattrennung chiraler Arzneistoffe auf Grund der zu erwartenden unterschiedlichen Wirkung der Enantiomeren große Bedeutung besitzt, setzte man die Polyamidadsorbentien zur Chromatographie konventionell meist nicht trennbarer racemischer Pharmaka ein.

1. 4-Methyl-1, 4-diphenyl-3, 5-pyrazolidindion

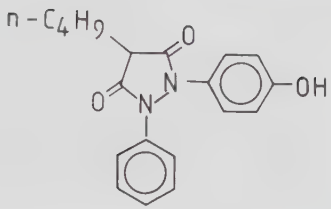
Durch stereoselektive Synthese 4, 4-disubstituierter 1-Phenyl-3, 5-pyrazolidindione erschloß Knabe [15] eine neue Substanzgruppe chiraler Wirkstoffe.



Durch unterschiedliche Alkylierung an C_4 des Heterocyclus erhält man ein konfigurationsstabiles Derivat. Die derzeit im Handel befindlichen Arzneistoffe Phenopyrazon und Oxyphenbutazon besitzen am Chiralitätszentrum ein Proton und können unter Verlust der Asymmetrie tautomere Strukturen ausbilden. Diese Stoffe sind lediglich pseudochiral.

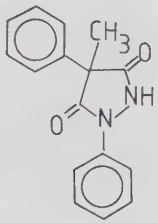


Phenopyrazon
(Bestandteil v. Osadrin^{R})



Oxyphenbutazon
(Tanderil^{R})

Am Beispiel des Derivates 10 sollte die säulenchromatographische Spaltbarkeit dieser Substanzklasse geprüft werden.



10

4-Methyl-1,4-diphenyl-3,5-pyrazolidindion

Das Racemat wurde an Adsorbens 1 und 2 chromatographiert. Die optische Ausbeute betrug:

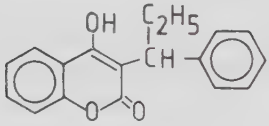
Adsorbens 1 Ag = 61,7 %
Adsorbens 2 Ag = 13 %

Stereoselektivität:

An beiden Säulen wurde bevorzugt der (-)-Enantiomer retiniert.

2. Phenprocoumon (Marcumar®)

Phenprocoumon, ein Antikoagulans vom Cumarintyp, wurde 1966 durch Racemattrennung über das Chinidinsalz optisch aktiv erhalten [16] und 1970 optisch aktiv synthetisiert. Bei dem im englischen Sprachraum gebräuchlichen Analogpräparat Coumadin (Warfarin®) zeigt der (S)-Antipode eine siebenmal stärkere blutgerinnungshemmende Wirkung als der (R)-Antipode [16].



11

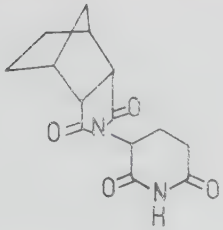
3-(1-Phenylpropyl)-4-hydroxycumarin
Phenprocoumon (Marcumar®)

Phenprocoumon sollte als Beispiel für einen stickstoffreien racemischen Arzneistoff, der dennoch zur Ausbildung von Wasserstoffbrücken befähigt ist, chromatographiert werden.

Die Substanz wurde an Adsorbens 1 aktiviert. Die optische Ausbeute lag bei 19,7 %, wobei der (R)-Enantiomer bevorzugt reteniert wurde. Durch diesen Versuch gelang auch die Anreicherung eines chiralen Pharmakons, das nur Sauerstoff als Heteroatom enthielt.

3. Biglumid

Biglumid, neuerdings Taglutimid genannt, ist ein von Koch und Koltan [17] entwickeltes Phthalimidoglutarimid-Analogon, das in klinischen Untersuchungen gute sedativ-hypnotische und schlafanstoßende Eigenschaften besitzt. Das Pharmakon soll jedoch keine teratogenen und embryotoxischen Nebenwirkungen aufweisen.



12

(R, S)-2-(Bicydo- 2, 2, 1 -heptan-2-endo-3-
-endodicarboximido-2, 6-piperidindion

Die Substanz ist durch Diels-Alder-Reaktion und anschließender Kondensation mit Glutaminsäure zugänglich. Zu pharmakologischen Untersuchungen wurde das endo-Isomere eingesetzt.

a) Isolierung

Biglumid ist von Kraft am Adsorbens 2 ohne Isolierung reiner Enantiomerer chromatographiert worden. In den Anfangs- und Endfraktionen wurden gleiche Absolutwerte des spezifischen Drehwertes gemessen. Dies läßt auf optische Reinheit dieser Fraktionen schließen. Trotzdem verhindert die sperrige raumfüllende Form des Moleküls gegenüber dem flachen Phthalimidring des Thalidomids die vollständige Racemattrennung.

Die Substanz wurde zuvor an Adsorbens 1 chromatographiert. Der Versuch ergab ähnlich wie beim Thalidomid eine wesentlich schlechtere Aktivierung (Ag = 11, 1 %) als am Cyclohexylpolymeren 2. Die Adsorption der Enantiomeren erfolgte an den Adsorbentien 1 und 2 mit entgegengesetzter Stereoselektivität. Säule 1 hielt den (+)-Antipoden, Säule 2 den (-)-Antipoden stärker zurück.

In zwei Einzelversuchen wurden 600 mg racemisches Biglumid an Adsorbens 2 chromatographiert. Die stark angereicherten Fraktionen des (+)-

und (-)-Enantiomeren wurden vereinigt. Man schnitt die Fraktionen kurz nach bzw. vor dem Elutionsmaximum der Antipoden, so daß Substanz ungefähr des ersten und letzten Viertels der Kurvenbanden gesammelt wurde. Da das Drehwertdiagramm einen relativ steilen Nulldurchgang zeigt, wurden auf diese Weise noch Anteile des jeweiligen anderen Enantiomeren miterfaßt, die man durch dreimaliges Recycling der beiden aktivierten Proben abtrennte. Dieses Verfahren ist in Abschnitt F näher erläuert.

Chromatographie der beiden isolierten Antipoden ergab jeweils nur einen symmetrischen Peak. Damit war die optische Reinheit der Enantiomeren bewiesen. Nach mehrmaliger Kristallisation aus Ethanol ermittelte man folgende Drehwerte:

(+)-Biglumid: $[\alpha]_{365} = +115,4^{o}$ $[\alpha]_{589} = +30^{o}$ (DMF)

(-)-Biglumid: $[\alpha]_{365} = -116,6^{o}$ $[\alpha]_{589} = -29,6^{o}$ (DMF)

Diese Werte bestätigen die in den Spitzenfraktionen gefundenen Daten der Einfachtrennung.

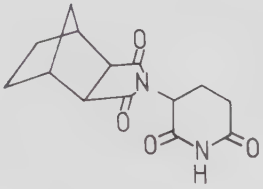
Die chemische Identität der Antipoden mit dem Racemat bewies man NMR-spektroskopisch und durch Elementaranalyse.

b) Racemisierung von Biglumid

Die Racemisierungsgeschwindigkeit der Enantiomeren wurde im Puffer/Dioxan-Gemisch bestimmt. Dioxan wurde als Lösungsvermittler zugesetzt. Für pH 7,4 wurde eine Halbwertszeit von 15 min gefunden. Der Einsatz der enantiomeren Wirkstoffe zum pharmakologischen Test erscheint wegen der leichten Racemisierbarkeit bei physiologischem pH-Wert wenig aussichtsreich.

c) Exobiglumid

Schon an früheren Beispielen wurde die hohe Spezifität der Polymeren gezeigt. Geringe chemische Variation am Racematmolekül ergeben oft große Abstufungen in der Trennung. Der überbrückte Heterocyclus des Biglumidmoleküls bietet eine interessante Möglichkeit, auch den Einfluß zweier geometrischer Isomere auf die Trennleistung zu untersuchen. Nach bekannten Vorschriften [18, 17], wurde die exo-Form des Biglumids synthetisiert und an Adsorbens 2 chromatographiert.



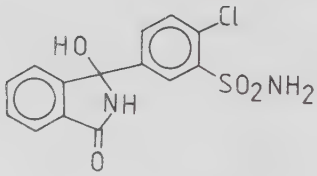
13

Exobiglumid

Man erhielt ein fast deckungsgleiches Chromatogramm zur diastereomeren endo-Form. Beide Substanzen weisen gleiche Retentionsvolumina auf. In den Anfangsfraktionen wurde für die exo-Form überraschenderweise annähernd der gleiche Drehwert gefunden. Dieses Resultat ist für den Adsorptionsmechanismus aufschlußreich. Die räumliche Anordnung des bicyclischen Teils der Molekel hat offensichtlich keinen Einfluß auf die Racemattrennung. Da dieser Rest weit vom Chiralitätszentrum entfernt und zudem nicht zur Wasserstoffbrückenbindung befähigt ist, beteiligt er sich nicht an der Ausbildung eines diastereomeren Adsorbates. Die Einpassung der Enantiomere in asymmetrische Nischen der Polymerkette erfolgte wahrscheinlich nur im Bereich um den Glutarimidring des Moleküls.

4. Chlorthalidon (Hygroton^{R})

Chlorthalidon gehört zur Stoffklasse der Monosulfonamid-Diuretika. Der racemische Arzneistoff ist seit 1959 im Handel. Bisher sind keinerlei Racemattrennungen bekannt. Eine stereoselektive Synthese ist nicht möglich, da das Chiralitätszentrum bei der letzten Stufe durch eine Ringschlußreaktion entsteht [19]. Eine konventionelle Spaltung über Diastereomere ist mangels geeigneter funktioneller Gruppen ebenfalls nicht durchführbar.



14

Chlorthalidon (Hygroton^{R})

(R, S)-3-(4-Chlor-3-sulfamoylphenyl)-3-hydroxy-oxoisoindolinon

a) Isolierung

Chlorthalidon wurde im Fließmittel Toluol/Dioxan 1 : 1 am Phenylalaninadsorbens 1 chromatographiert. Das Racemat wurde vollständig in die Enantiomeren zerlegt. Nach 2500 ml eluierte der (-)-Antipode, und nach 240 ml substanzfreiem Zwischenraum folgte der (+)-Antipode. Das Schreiberdiagramm zeigte zwei getrennte Drehwert- und Massenpeaks. Der Versuch wurde dreimal durchgeführt, wobei im Wiederholungsfall die Säulentemperatur nach Elution von (-)-Chlorthalidon auf 40^{o} C erhöht wurde, womit sich die Elutionsgeschwindigkeit für das (+)-Enantiomer erhöht und damit der Zeitbedarf für die Trennung abgekürzt wurde (Abb. 4).

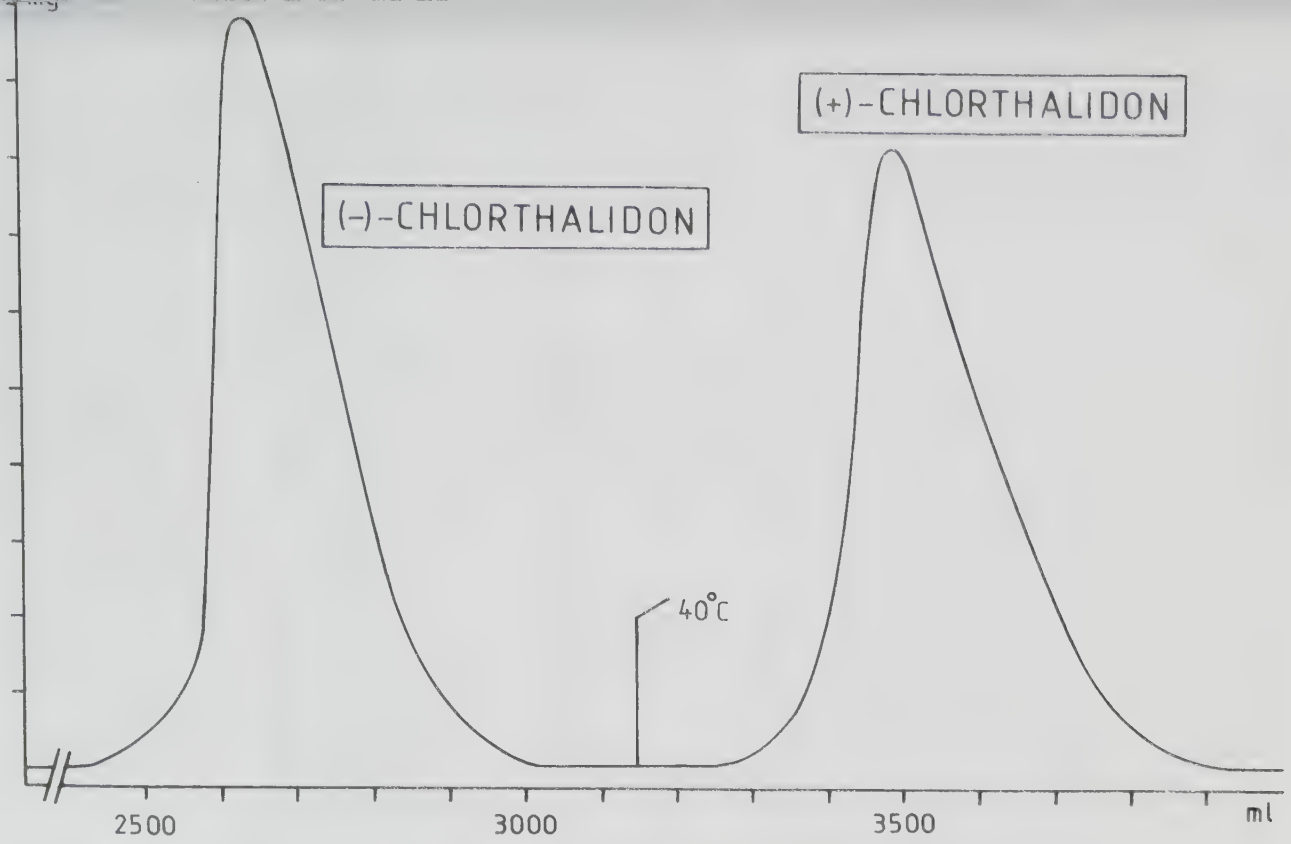


Abb. 4 : Chromatographie von 530 mg Chlorthalidon (14) an 250 g Polyamid 1 (76 x 3, 2 cm)
Elutionsmittel Toluol/Dioxan 1 : 1

Auch bei einer Säulenbelastung mit 530 mg Racemat (Gewichtsverhältnis Racemat/Adsorbens 1 : 470) verlief die Trennung vollständig. So konnten beide Enantiomere problemlos und ohne großen Zeitaufwand erstmals rein erhalten werden. Der Trennfaktor α betrug 1,45, die Auflösung $R_S = 2,7$.

Die in der Literatur für das Racemat angegebene 50 %ige Essigsäure konnte als Lösungsmittel zur Umkristallisation nicht verwendet werden, da im sauren pH-Bereich die Substanz racemisierte. Die Enantiomeren konnten beim Umkristallisieren aus Chloroform durch das darin enthaltene HCl ebenfalls nicht optisch rein isoliert werden. Eine racemisierungsfreie Kristallisation war aus absolutem Aceton/Pentan-Gemisch durchführbar.

Man erhielt folgende Konstanten:

$$[\alpha]_{365}^{20} = -593,6^{\circ} \; / \; +595,2^{\circ} \text{ (Dioxan p. a.)}$$

$$[\alpha]_{589}^{20} = -140,1^{\circ} \; / \; +140,9^{\circ} \text{ (Dioxan p. a.)}$$

Die chemische Identität der Antipoden bewies man durch NMR und Elementaranalyse.

b) Racemisierungskinetik

Optisch aktives Chlorthalidon racemisiert ebenfalls sehr leicht in alkalischer Lösung. Bei 20° C liegt die Halbwertszeit der Racemisierung einer Chlorthalidonlösung in gleichen Teilen Dioxan und Phosphatpuffer pH 7,4 bei nur 3 Minuten. In wäßrigem Puffer war die Substanz nicht ausreichend löslich. (Abb. 5).

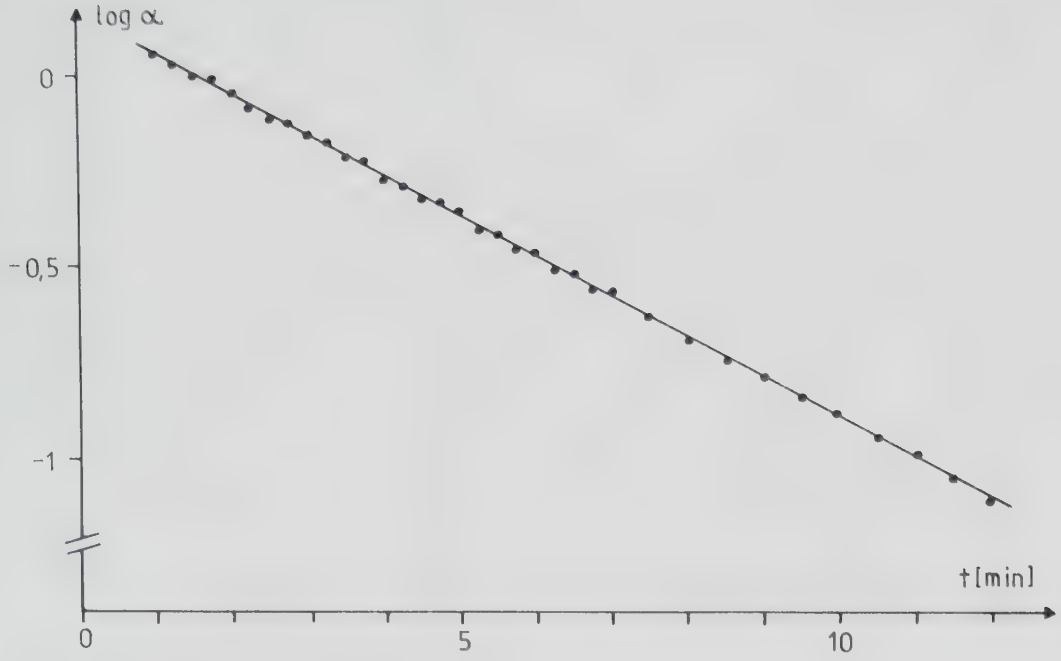


Abb. 5 : Racemisierung von (-)-Chlorthalidon
α_{365} (10 cm-Küvette); pH 7,4

Die Kinetikuntersuchung wurde auf neutrale und saure pH-Bereiche ausgedehnt. Die Racemisierungsgeschwindigkeit ist vom pH-Wert abhängig. Im schwach sauren Bereich erweist sich Chlorthalidon im beobachteten Zeitraum von 7 Stunden als stabil. Die k_1-Konstanten und Halbwertszeiten zeigt Tabelle 2:

Racemisierungsgeschwindigkeit von Chlorthalidon
in Abhängigkeit vom pH-Wert

pH	k_1 min^{-1}	$\frac{t}{2}$ Racemisierung
0	0,060	11,57 Minuten
1,2	0,0016	7,2 Stunden
2,2	0	——
3	0	——
4	0	——
6	0,017	40,05 Minuten
7,4	0,239	2,89 Minuten

In Abbildung 6 sind die Geschwindigkeitskonstanten 1. Ordnung gegen den pH der Lösung aufgetragen.

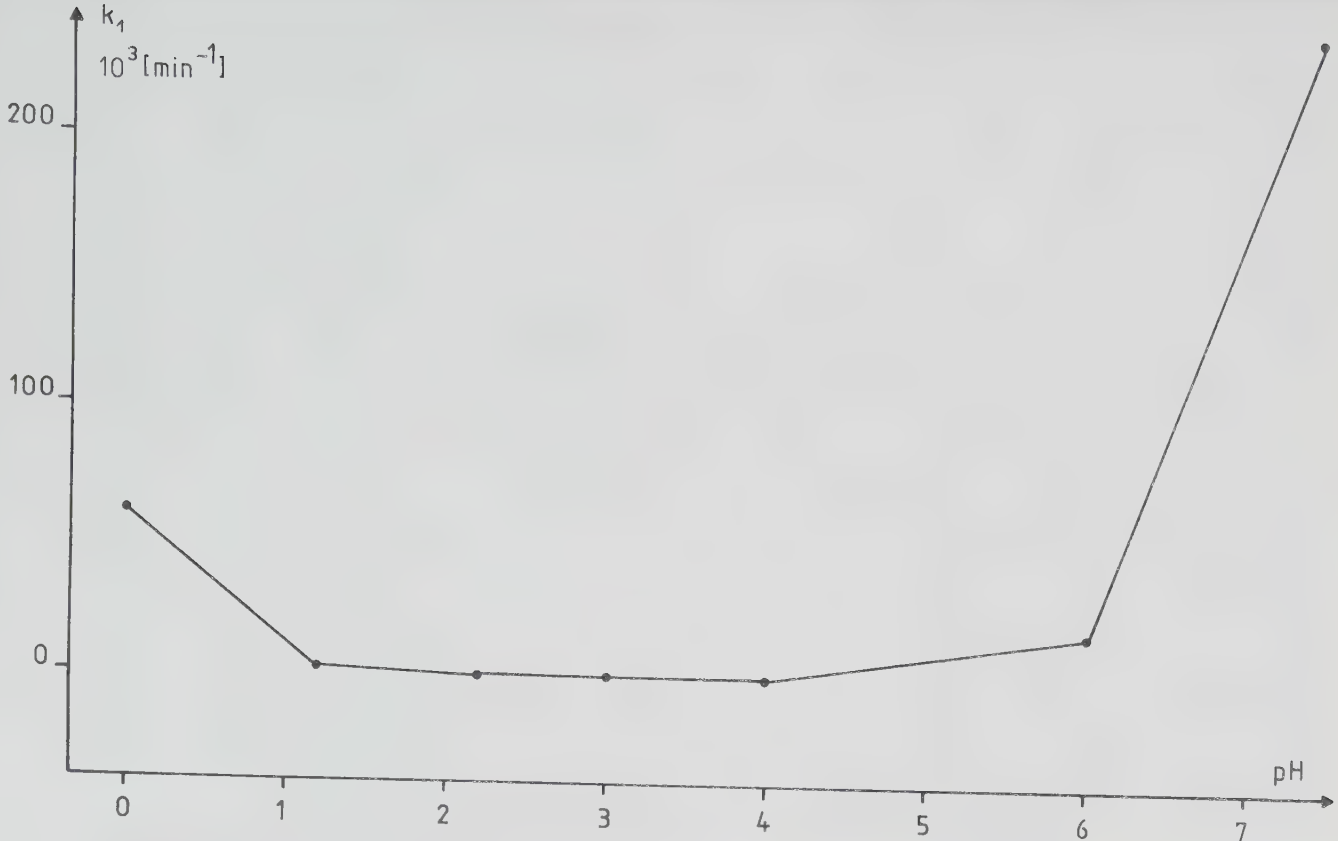
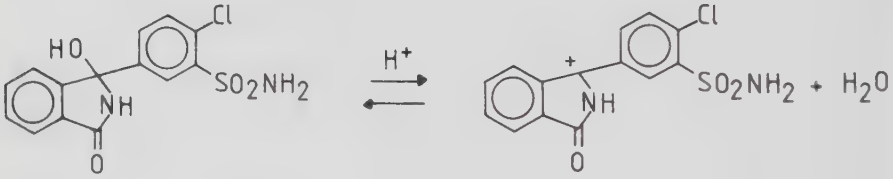


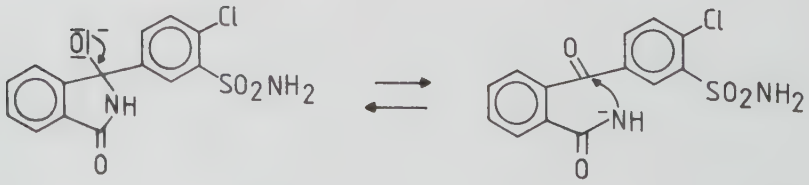
Abb. 6 : PH/Geschwindigkeitsprofil der Racemisierung der Chlorthalidonenantiomeren

Das pH/Geschwindigkeitsprofil des Chlorthalidons erinnert an die Hydrolyse der Acetylsalicylsäure[20]. Auch hier wurde ein Minimum der Reaktionsgeschwindigkeit für pH 2 - 4 gefunden. Dieses Verhalten läßt sich durch die Überlagerung zweier Katalysemechanismen erklären.

Ebenso können für Chlorthalidon zwei Reaktionsmechanismen postuliert werden. In nucleophilen Lösungsmitteln erfolgt unter H^+-Katalyse der Austausch der OH-Gruppe über die Bildung des resonanzstabilisierten Carbeniumions.



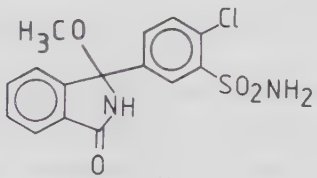
Diese SN_1-Reaktion bedingt den Verlust der optischen Aktivität. Im pH-Bereich 2 - 4 erfolgt keine Wasserabspaltung am quartären C-Atom, da die Protonenkonzentration zu gering ist. Der Wirkstoff hat hier sein Stabilitätsmaximum. Im alkalischen Milieu racemisiert die Substanz wahrscheinlich unter Ringöffnung analog dem Phenolphthaleinmechanismus.



Optisch aktives Chlorthalidon erwies sich zwar im Magensaft-pH als konfigurationsstabil, eine pharmazeutische Anwendung der Enantiomeren kommt aber auf Grund der extrem leichten Racemisierbarkeit bei physiologischem pH von 7,4 nicht in Frage.

c) Chlorthalidonmethylether

Wie das Testracemat Mandelamid trägt das kompliziert gebaute Chlorthalidonmolekül am Asymmetriezentrum eine OH-Gruppe in Nachbarschaft zu einer Amidfunktion. Um abzuklären, ob diese OH-Funktion für das Phenylalaninadsorbens zur Komplexierung besonders geeignet ist, stellte man den Methylether des Chlorthalidons her [19].



15

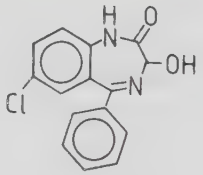
Chlorthalidonmethylether

Das Derivat wurde unter gleichen Bedingungen wie Chlorthalidon an Adsorbens 1 chromatographiert. Die Substanz eluiert bereits nach 1600 ml. Es wurde eine optische Ausbeute von 85,7 % ermittelt. Da der spezifische Drehwert ebenfalls unbekannt ist, wurden die (-)-Fraktionen der ersten aufsteigenden Elutionsbande bis zum Maximum des (-)-Enantiomeren zusammengefaßt und gesondert chromatographiert. Ein symmetrischer Peak bestätigte die optische Reinheit der Probe. Der gefundene Drehwert war mit den Spitzenwerten des Racemattrennversuches identisch und wurde als spezifischer Drehwert der Berechnung zugrundegelegt.

Die Methylierung einer OH-Gruppe am Chiralitätszentrum verschlechtert somit die Trennung an Adsorbens 1.

5. Oxazepam (Adumbran^{R})

Das Psychopharmakon Oxazepam stellt ebenfalls ein chirales Pharmakon mit einer Hydroxygruppierung am Chiralitätszentrum dar.



16

7-Chlor-3-hydroxy-4-oxo-5-phenyl-1,2-dihydro-3H-1,4-benzodiazepin

Oxazepam gehört zur Gruppe der Tranquilizer, deren charakteristische Hauptwirkung spannungs- und angstlösende Eigenschaften sind. Die Enantiomere dieses Arzneistoffes waren bis jetzt unbekannt. 1976 konnte jedoch der Hemisuccinatester des Oxazepams durch Spaltung als Ephedrinsalz optisch aktiv erhalten werden[21)]. Im pharmakologischen Test erwies sich die D-Form als besser wirksam. D-Oxazepamhemisuccinat hat eine ca. fünfzigfach höhere Affinität zu Serumalbumin als das L-Isomer[22)]. Diese Stereospezifität der Eiweißbindung stellt einen ungewöhnlichen Befund dar.

a) Isolierung

Durch Chromatographie am Adsorbens 1 erzielte man ebenfalls eine vollständige Racemattrennung. Es wurden 45,6 mg racemisches Oxazepam aufgetragen und Toluol/Dioxan 1 : 1 als Fließmittel verwendet. Das Schreiberdiagramm zeigt zwei separate Peaks, jedoch beträgt trotz geringerer Belastung der Säule das substanzfreie Zwischenvolumen nur 25 ml. Der (-)-Antipode wird stärker retiniert. Bei Chromatographie der sonst üblichen 300 mg erhält man erste Mischfraktionen. Die Racematspaltung des Oxazepams ist also als Grenzfall einer quantitativ verlaufenden Trennung zu betrachten (Abb. 7).

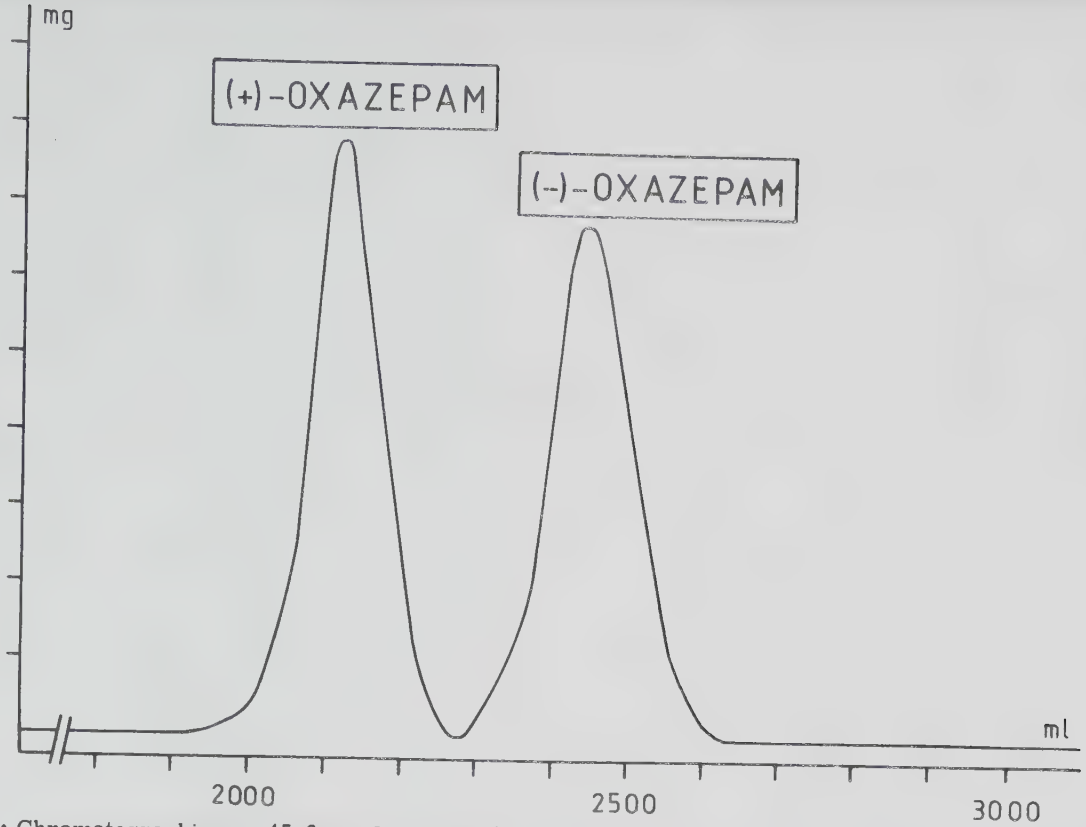
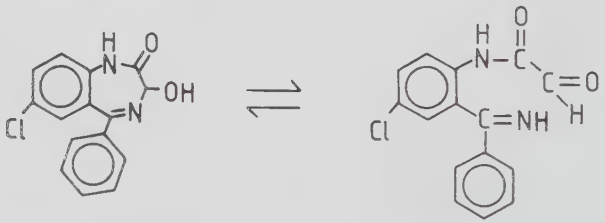


Abb. 7: Chromatographie von 45,6 mg Oxazepam (16) an 250 g Polyamid 1 (76 x 3,2 cm)
Elutionsmittel Toluol/Dioxan 1:1

Die Racemisierungsneigung der Oxazepamenantiomeren ist sehr groß. Bereits unter dem katalytischen Einfluß der Glasoberfläche der Küvetten racemisieren die Proben. Unter Ringöffnung bildet sich nach Jommi am Chiralitätszentrum aus der halbacetal-aminalischen eine offene Aldehydstruktur aus [23]. Dieser mögliche Mechanismus wäre mit dem Mutarotationsgleichgewicht der Monosaccharide vergleichbar und wird vermutlich auch durch Säuren oder Basen katalysiert.

Der Versuch wurde aus diesem Grund in absoluten, neutral reagierenden Lösungsmitteln wiederholt.



Um zumindest teilaktivierte Substanz zu gewinnen, fing man die Antipoden in Kunststoffgefäßen auf und dunstete die Fraktionen durch schonende Ventilation sofort nach der Elution ein. Die gefundenen Drehwerte waren je nach Racemisierungsgrad unterschiedlich. In einigen Fraktionen wurden Drehwinkel von $[\alpha]_{365} = 900^{o} - 1000^{o}$ gemessen. Eine gravimetrische Massenbestimmung war nicht möglich, da die Polypropylenfläschchen Lösungsmittel adsorbiert hatten. Man bestimmte deshalb die Gewichtsmenge nach der Drehwertmessung der Fraktionen UV-spektroskopisch. Der absolute spezifische Drehwert wurde aus dem Schreiberdiagramm errechnet. Der spezifische Drehwert lag ungewöhnlich hoch.

$[\alpha]_{365} = +1519^{o} \;/\; -1513^{o}$ (Toluol/Dioxan 1 : 1)

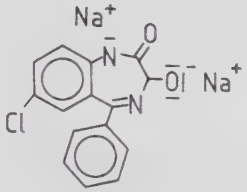
$[\alpha]_{589} = +432,9^{o} \;/\; -431,2^{o}$ (Toluol/Dioxan 1 : 1)

Der Trennfaktor α betrug = 1,27, die Auflösung R_S = 1,17

Für solch extrem leicht racemisierenden Verbindungen ist die chromatographische Racemattrennung bisher die einzige Möglichkeit zur Isolierung der Enantiomeren.

b) Bestimmung der absoluten Konfiguration des Oxazepams

Dem rechtsdrehenden Enantiomeren des Oxazepamhemisuccinatesters war die (S)-Konfiguration zugeordnet worden[23]. Bei Behandlung dieses Antipoden mit 3 Äquivalenten Natriumalkoholat in absolutem Ethanol fiel das optisch aktive Natriumsalz des Oxazepams aus, welches in DMF Rechtsdrehung ($[\alpha]_{589}^{20} = +534^{o}$) zeigte.



17

Da die Alkoholyse unter Konfigurationserhalt verlaufen war, ist das aus dem rechtsdrehenden Hemisuccinat hergestellte Na-Salz auch (S)-konfiguriert. Die Zugabe von Wasser ergab racemisches Oxazepam.

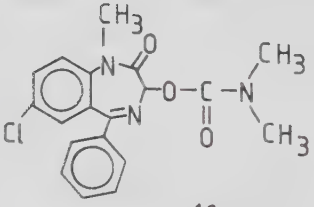
Es sollten nun die chromatographisch isolierten Oxazepamenantiomeren in ihre Salze überführt, ihre Drehrichtung ermittelt und daraus die absolute Konfiguration abgeleitet werden. Zu dieser Untersuchung verwendete man teilweise racemisierte Antipoden. Der Drehwert einer (+)- und einer (-)-Fraktion des Oxazepams wurde zunächst in absolutem DMF gemessen. Es trat im Vergleich zu den in Toluol/Dioxan gefundenen Drehwerten kein Wechsel der Drehrichtung ein. Nach Überführung des (+)-Enantiomeren in sein Natriumsalz fand man wiederum Rechtsdrehung; für das Salz des (-)-Antipoden Linksdrehung.

Damit kann die absolute Konfiguration des Oxazepams angegeben werden:

(+)-Antipode des Oxazepams: (S)-konfiguriert
(-)-Antipode des Oxazepams: (R)-konfiguriert

6. Camazepam (Albego R)

Camazepam ist ein neuer Tranquilizer vom Typ der 1,4-Benzodiazepine.



18

Camazepam (Albego R)

Es wurde 1979 in die Therapie eingeführt. Sein Wirkungsspektrum entspricht dem der anderen Benzodiazepine, allerdings soll die Spanne zwischen verhaltensverändernder und aktivitätsmindernder Dosis besonders ausgeprägt sein. Bei der Biotransformation wird der Carbaminsäureester gespalten. Das 1-Methyl-oxazepam stellt möglicherweise eine Wirkform von Albego- dar.

Auf Grund der strukturellen Verwandtschaft des Camazepams mit dem Oxazepam war eine gute Aktivierung der Substanz an Adsorbens 1 zu erwarten. Da das Proton an der OH-Gruppe substituiert ist, sollten die Enantiomere des Camazepams ähnlich wie die des Oxazepamhemisuccinates konfigurationsstabil sein und vermutlich ebenfalls eine stereoselektive Wirksamkeit aufweisen.

Camazepam konnte an Adsorbens 1 unter den Standardbedingungen nicht eluiert werden. Auch nach Temperaturerhöhung auf 40° C haftete die Substanz fest auf der Säule. Nach Elution von 4,3 l Fließmittel wurde der Versuch abgebrochen.

E. Prüfung der Anwendungsbreite von Cellulosetriacetat und Vergleich mit den Polyamidadsorbentien

I. Synthese und Trennprinzip des Cellulosetriacetats

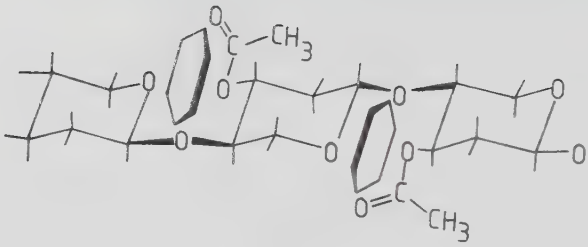
1. Synthese

Mikrokristalline Cellulose läßt sich nach dem Schering-Verfahren unter Erhalt der Faserstruktur heterogen vollständig acetylieren[24]. Die Reaktion wurde in Benzolsuspension mit Acetanhydrid/Eisessiggemisch und Perchlorsäure als Katalysator durchgeführt. Die Reinigung des Produktes erfolgte durch mehrmaliges Waschen mit Methanol. Die spröden Klumpen wurden in einer Mörsermühle zerkleinert und die Siebfraktion 90 - 56 µm zur Säulenchromatographie verwendet.

2. Trennprinzip

Folgende Vorstellungen des Trennmechanismus sind von Hesse[13] entwickelt und teilweise bewiesen worden. Die lamellare Anordnung der Cellulosefasern nach Art eines Kristallgitters ermöglicht wie ein zweidimensionales Molekularsieb die Inklusion von Gastmolekülen. Diese werden zwischen zwei Ebenen der Schichtstruktur eingeklemmt und sind von allen Seiten von Asymmetrie umgeben, da die sterisch festgelegten Estergruppen der Cellulose auch in die Zwischenräume hineinreichen.

Eine besonders hohe Affinität zu der mikrokristallinen Acetylcellulose hat der Benzolkern, wenn mindestens drei benachbarte Stellen nicht substituiert sind. Der flache, scheibenförmige Aromat paßt besonders gut in die durch Quellung vergrößerten Zwischenräume der geordnet übereinanderliegenden Celluloseacetatbänder. Befindet sich ein Phenylring am Chiralitätszentrum des Substrates, dient er als Verankerung der chiralen Verbindung zwischen je zwei Pyranringen der acetylierten Glucoseeinheiten. Diese definierte Inklusion des Benzolkernes ersetzt die sonst übliche Salzbildung oder Komplexierung mit dem optisch aktiven Partner und liefert besonders günstige Voraussetzungen für die Racemattrennung.



Bindungsmöglichkeit des Benzolkerns an
der maximal gestreckten Acetylcellulose

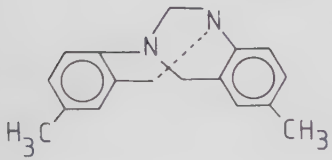
Das zu trennende Racemat braucht also nicht unbedingt funktionelle Gruppen zur Adsoprtion an die chirale Matrix zu besitzen.

Beim Umfällen des mikrokristallinen Cellulosetriacetates werden die kristallinen Bereiche vernichtet, wodurch auch die gute Trennleistung verlorengeht.

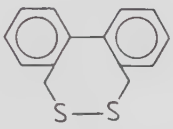
Das unterschiedliche Trennvermögen mikrokristallinen und amorphen Cellulosetriacetates erinnert an die Befunde bei den synthetischen Polyamiden. Auch hier hatte sich nur beim Polymerisationsvorgang optisch aktiver Monomerer eine regelmäßige Anordnung der optisch aktiven Reste ausgebildet, die eine Trennleistung ermöglichte. Durch polymeranaloge Umsetzung erhaltene Adsorbentien trennten nicht.

Eine besonders günstige Struktur zur Trennung an Cellulosetriacetat ist die Kombination eines nicht weiter substituierten Phenylringes und eine in der Nähe liegende Carbonylgruppe. Das Adsorbens zeigt aber auch gegenüber sehr unpolaren mehrkernigen, aromatischen Racematen sowie Ethern eine hohe Trennleistung.

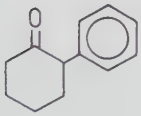
Am Cellulosetriacetat gelang Hesse und Mitarbeitern die vollständige Enantiomerentrennung folgender sechs Racemate:



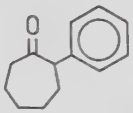
Trögersche Base



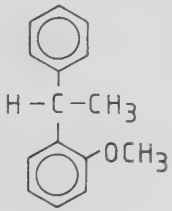
1, 2-Dithia-4, 5, 6, 7-dibenzo-cyclooctadien



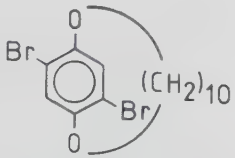
2-Phenylcyclohexanon



2-Phenylcycloheptanon

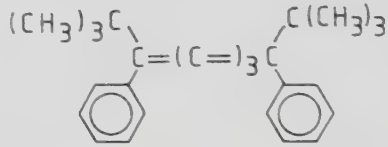


2-(1-Phenylethyl)anisol



2, 6-Dibrom-O, O'-decamethylen-hydrochinon

Eine andere Arbeitsgruppe trennte das chirale Pentatetraen an einer gekühlten Säule in einem Durchlauf ebenfalls quantitativ auf [25].



Die Autoren konnten zeigen, daß Racemate, die als einzige Gemeinsamkeit einen oder mehrere Benzolkerne besitzen, stets optimal am Cellulosetriacetat aktiviert werden.

II. Chromatographie von Modellsubstanzen

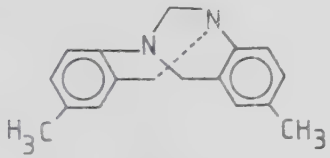
Zum Vergleich mit den Ergebnissen an Polyamiden wurde eine Reihe von Testracematen an mikrokristallinem Cellulosetriacetat chromatographiert, die Schwanghart und Kraft bereits an Polyamiden untersucht hatten. Ausgewählt wurden Racemate der Substanzklassen:

α-substituierte Phenylacetamide
N-Benzoylaminosäureethylester
Substituierte Acetamide
Cyanessigsäureamide
Carbonsäuren
Benzoinderivate

Die an Polyamidadsorbentien ebenfalls getesteten α-Phenylessigsäuren sind teilweise in der Arbeitsgruppe Hesse bereits chromatographiert worden.

Die Trennleistung des Cellulosetriacetates wird jeweils mit dem besten der an Polyamidadsorbentien erzielten Ergebnisse verglichen. Allerdings lassen die unterschiedlichen Adsorbensmengen und Säulenlängen keinen exakten Vergleich zu.

Nach Herstellung des Adsorbens 3 wurde zum Beweis der Gleichwertigkeit mit der von Hesse und Hagel synthetisierten Triacetylcellulose das Racemat der Trögerschen Base chromatographiert.



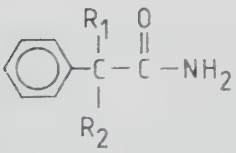
19

Trögersche Base

Unter gleichen Versuchsbedingungen mit dem Standardfließmittel 95 % Ethanol konnte die vollständige Racematspaltung reproduziert werden.

In allen folgenden Chromatographieversuchen wurde an einer Säule 85 x 2,5 cm Schichthöhe, gefüllt mit 205 g Adsorbens gearbeitet. Aufgetragen wurden in der Regel 200 mg Racemat, als Elutionsmittel wurde stets 95 % Ethanol verwendet.

1. α-substituierte Phenylacetamide



20

	R_1	R_2
a	H	OH
b	H	OCH_3
c	H	$OCOCH_3$
d	H	CH_2OH
e	CH_3	OH

Optische Ausbeute:

Adsorbens 3 besitzt gegenüber Mandelamid (20a) sehr gute Trenneigenschaften. Ag 92,9 % (Abb. 8).

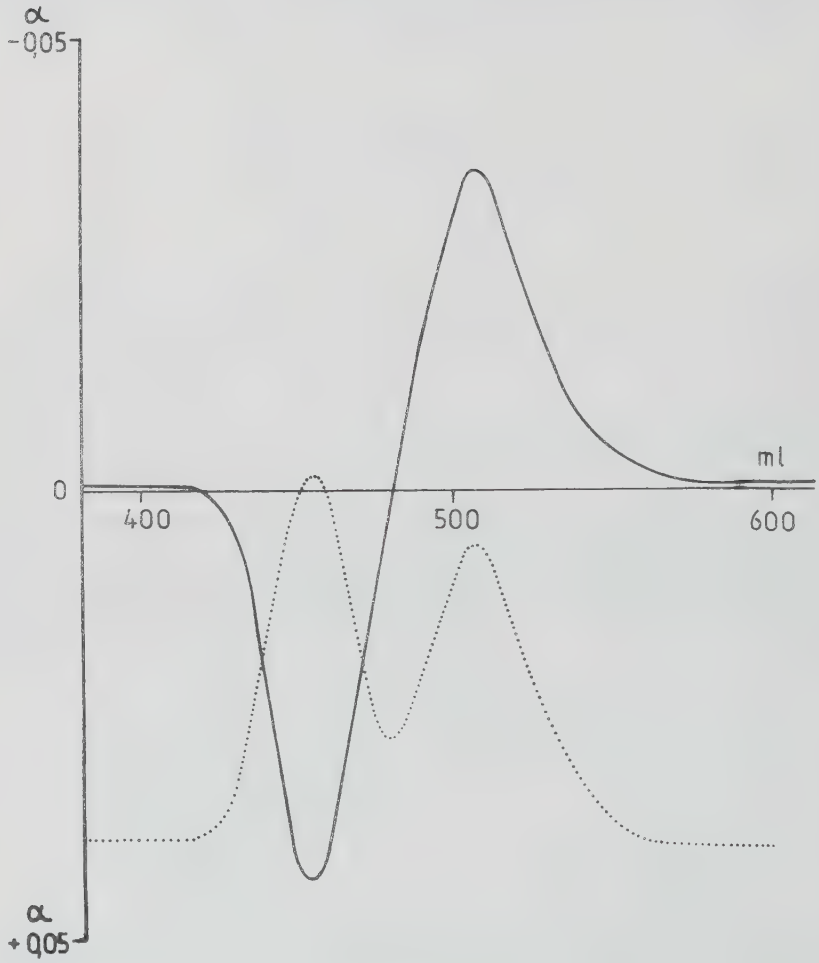


Abb. 8: Chromatographie von 204 mg (R, S)-Mandelamid
an 205 g Cellulosetriacetat (85 x 2,5 cm)
Elutionsmittel: 95 % ETOH
Drehwert/Massendiagramm, —— Drehwertkurve, ---- UV-Kurve

Auch nach Methylierung der alkoholischen Hydroxylgruppe wird die Trennleistung nur geringfügig verschlechtert. Die Enantiomeren des O-Methylmandelamids (20b) werden zu 80,5 % angereichert. Die optische Ausbeute des Acetylderivates 20c betrug dagegen nur 25,4 %. Die zusätzliche Estergruppe am Chiralitätszentrum ist vermutlich zu voluminös, um noch eine gute Einpassung der Enantiomeren in die asymmetrischen Nischen des Cellulosetriacetatgels zu ermöglichen. Ähnlich sterisch gehindert scheint die Inklusion der Tropasäureamidantipoden (20d) zu sein. Das Racemat wird mit 31,3 % optischer Ausbeute aktiviert. Racemisches Atrolactinsäureamid (20e) wird zu 42,6 % angereichert, auch hier nimmt die Trennleistung im Vergleich zu Mandelamid bei Vergrößerung der Substituenten am Chiralitätszentrum ab.

Stereoselektivität:

Die Stereokomplexierung der α-Phenylacetamide erfolgt unter bevorzugter Retention des (R)-konfigurierten Enantiomeren.

Tabelle 3: Trennergebnisse α-substituierter Phenylacetamide 20a-e

Racemat	Ag CTA	K	Ag Polyamid	Adsorbens
a	92,9	R	80,0	2
b	80,5	R	48,2	5
c	25,4	R	63,2	2
d	31,3	R	68,6	1
e	42,6	R	38,9	5

CTA = Cellulosetriacetat

K = Konfiguration des bevorzugten adsorbierten Enantiomeren

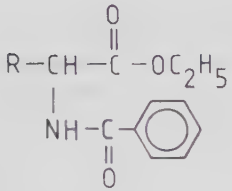
Trotz unterschiedlicher Anreicherung der Phenylacetamide sind die Retentionsvolumina mit Ausnahme des Tropasäureamids, das etwas schneller eluiert wurde, gleich. Für das enantiomerenspezifische Eindringen in die chirale Matrix ist Größe und Gestalt des Gesamtmoleküls, für die Verankerung der Phenylrest verantwortlich.

Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

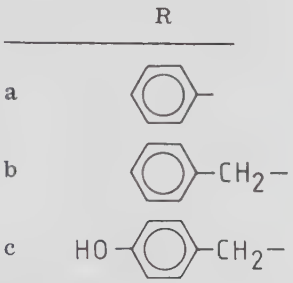
Mandelamid (20a) trennen beide Adsorbentientypen mit ähnlich hohen Ausbeuten auf. Das O-Methylderivat 20b wird am Cellulosetriacetat fast noch gleich gut wie Mandelamid gespalten. Die Trennleistung für dieses Racemat sinkt bei den Polyamiden auf die Hälfte ab. Bei Methylierung der alkoholischen Hydroxylgruppe fallen die Wasserstoffdonatoreigenschaften dieser funktionellen Gruppe weg. Die Fixierung der Enantiomeren in den chiralen Strukturen der Polymeren wird gelockert. Auf Grund des anderen Sorptionsmechanismus hat eine Methylierung der OH-Gruppe beim Cellulosetriacetat kaum Einfluß auf die Trenneigenschaften. Dies ändert sich jedoch, wenn der Substituent am Sauerstoff voluminöser wird und das Molekül am Cellulosetriacetat nur noch unzureichend inkludiert werden kann. Die bessere Aktivierung des Acetylmandelamids (20c) am Polyamid ist wahrscheinlich auf den zusätzlich hinzugekommenen Substituenten mit Wasserstoffbrückenbindungseigenschaften zurückzuführen. Gleiches gilt für Tropasäureamid (20d). Die Anreicherung des Atrolactinsäureamids (20e) an beiden Vergleichsadsorbentien entsprechen sich.

2. N-Benzoylaminosäureethylester

Es wurden folgende Aminosäurederivate chromatographiert:



21



Auf einfachere Aminosäurederivate wurde verzichtet, da für diese keine Vergleichsergebnisse an Amidsäulen vorlagen.

Optische Ausbeute:

Beim Phenylglycinderivat 21 a wurde eine Aktivierung von 42,8 % erzielt. Das Phenylalaninderivat 21 b konnte zu 25,9 % am Cellulosetriacetat angereichert werden. Der Tyrosinethylester 21 c wurde dagegen nicht getrennt. Beim Übergang von Pheylglycin- zum Phenylalaninester nimmt die Trennleistung ab, da sich der unsubstituierte Aromat nicht mehr direkt am Asymmetriezentrum des Moleküls befindet. Die Parasubstitution des Aromaten beim Tyrosinester 21 c verhindert zusätzlich das Eindringen des Benzolkerns in die aktiven Zentren der Matrix.

Die fast gleichen Retentionszeiten der drei Testsubstanzen sind durch unspezifische Komplexierung am Aromaten der Benzoylgruppe zu erklären.

Stereoselektivität:

Bei den Derivaten 21 a und 21 b wird der (R)-Enantiomer stärker zurückgehalten.

Tabelle 4: Trennergebnisse der N-Benzoylaminosäureethylester 21a - c

Racemat	Ag CTA	K	Ag Polyamid	Adsorbens
a	42,8	R	20,7	6
b	25,9	R	58,3	2
c	0	-	80,7	2

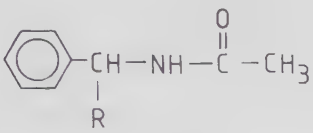
Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

In der Reihe der N-Benzoylaminosäureester sind ebenfalls erhebliche Unterschiede in den Trennleistungen der beiden Adsorbentientypen gefunden worden.

Am Cellulosetriacetat erhielt man für das Phenylglycinderivat 21 a eine doppelt so hohe Ausbeute als am besten Polyamid 6. Dieses Ergebnis kehrt sich für das Phenylalaninderivat 21 b um. Das Tyrosinderivat 21 c wird am Cellulosetriacetat nicht mehr aktiviert. Am Polyamid 2 ist dagegen eine hohe Anreicherung erzielt worden.

3. Substituierte Acetamide

Folgende Derivate wurden ausgewählt:



22

	R
a	CH_3
b	$CH(CH_3)_2$
c	CN

Optische Ausbeute:

Die Variation R hat auf das Trennergebnis in dieser Substanzklasse entscheidenden Einfluß. Das Isopropylderivat 22 b wird am Cellulosetriacetat mit einer optischen Ausbeute von 92,5 % hoch aktiviert. N-Acetyl-1-phenylethylamin (22 a) kann zu 43,6 % angereichert werden. Ist R eine Nitrilgruppe, 22 c, so sinkt die Trennleistung auf 7.3 %. Daraus darf nicht geschlossen werden, daß Carbonylderivate als Rest R schlecht getrennt werden, denn der strukturähnliche Aminosäureester 21 a aus Abschnitt 2 wurde immerhin zu 43 % angetrennt.

Stereoselektivität:

In dieser Reihe kehrt sich die stereoselektive Adsorption um. Bei Derivat 22 a und 22 b wird unter entsprechend hoher Anreicherung der (R)-Antipode stärker zurückgehalten. Von Verbindung 22 c wird unter schlechter Aktivierung der (S)-Enantiomer bevorzugt komplexiert.

Tabelle 5 : Trennergebnisse der substituierten Acetamide 22 a - c

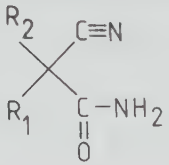
Racemat	Ag CTA	K	Ag Polyamid	Adsorbens
a	43,6	R	36,2	6
b	92,5	R	54,9	6
c	7,3	S	49,1	6

Vergleich der beiden Adsorbentientypen:

Während Adsorbens 6 alle Racemate dieser Reihe stets am besten und untereinander etwa gleich hoch aktivierte, zeigte das Cellulosetriacetat eine extrem unterschiedliche Spezifität gegenüber den einzelnen Racematen. Das Isopropylderivat 22 b wurde überdurchschnittlich gut aktiviert, während das N-Acetyl-α-cyanbenzylamin (22 c) schlecht getrennt wurde.

4. Cyanessigsäureamide

Um den Einfluß einer Nitrilgruppe eingehender zu untersuchen, wurden zwei Cyanessigsäureamide am Cellulosetriacetat chromatographiert.



23

	R_1	R_2
a		C_2H_5
b		CH_3

Optische Ausbeute:

Racemat 23 a wurde quantitativ aufgetrennt und stellt das beste in dieser Arbeit mit einem Testracemat gefundene Ergebnis an Adsorbens 3 dar (Abb. 9). Trennfaktor $\alpha = 2,6$, Auflösung $R_S = 2,9$. Zwischen den beiden Enantiomeren liegt ein substanzfreies Zwischenvolumen von 100 ml. Die Antipoden des Phenylcyanessigsäureamids waren unbekannt. Es wurde ein Drehwert von

$_{589} = -20^{o}$ (ETOH)

$_{589} = +19,9^{o}$ (ETOH) ermittelt.

Racemat 23 b wurde ebenfalls aktiviert, wie dem Chromatogramm zu entnehmen ist, zeigte die UV-Kurve jedoch nur einen Massenpeak. Da der spezifische Drehwert der Antipoden von 23 b ebenfalls nicht bekannt ist, wurden die identischen Spitzenwerte zur Berechnung der optischen Ausbeute herangezogen. Die Anreicherung betrug 48,7 %.

Stereoselektivität:

Die Elution erfolgt in beiden Fällen unter stabilerer Komplexierung des (+)-Enantiomeren.

Tabelle 6: Trennergebnisse der Cyanessigsäureamide 23 a - b

Racemat	Ag CTA	K	Ag Polyamide	Adsorbens
a	100	(+)	50	1
b	48,7	(+)	-	-

Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

Racemat 23 a wurde am Cellulosetriacetat quantitativ in die Enantiomeren gespalten. Am einzig untersuchten Polyamidadsorbens 1 betrug die Aktivierung 50 %.

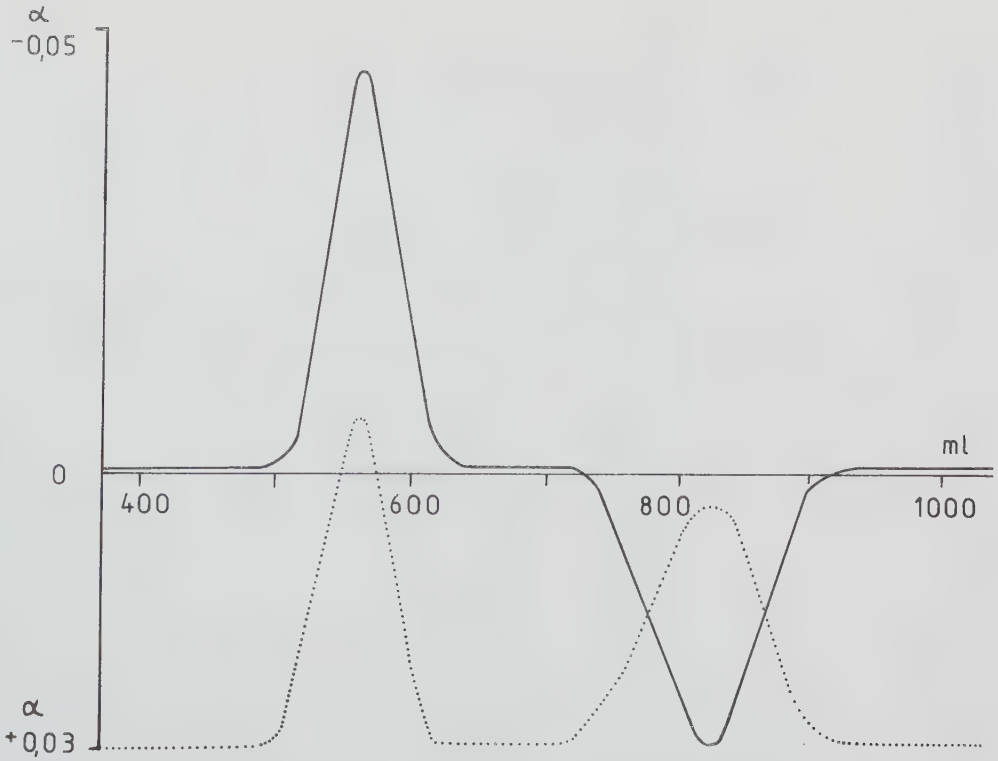
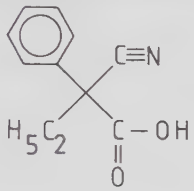


Abb. 9 : Chromatographie von 101, 6 mg Phenylethylcyanessigsäureamid (23 a) an
205 g Cellulosetriacetat (85 x 2, 5 cm)
Elutionsmittel 95 % ETOH
Drehwert/Massendiagramm, —— Drehwert, ---- UV-Kurve

5. Carbonsäuren

Hesse und Hagel beschreiben Verbindungen mit freier Carboxylgruppe als "inklusionsfeindlich", da sie ebenfalls wie andere stark polare Gruppen nur geringfügig getrennt werden. Auch Phenylethylcyanessigsäure wurde kaum angereichert in wenigen Fraktionen eluiert. Eine Carboxylgruppe erniedrigt in allen Fällen das Retentionsvolumen entscheidend.



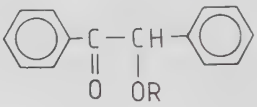
24
Phenylethylcyanessigsäure

Vergleich der Trennung von Mandelsäure beider Adsorbenstypen:

Die Anreicherung der Mandelsäure lag am Cellulosetriacetat unter 10 %, wenn das Standardfließmittel Ethanol 95 % verwendet wurde. Mandelsäure konnte jedoch von Hesse und Hagel in Wasser/Ethanol (2 : 1) mit 30 % Ausbeute aktiviert werden[4]. Das beste Chromatographieergebnis für Mandelsäure lag bei 51 % am Phenylalaninadsorbens 1 und am Cyclohexylaminpolymeren 2.

6. Benzoinderivate

Mit den Benzoinderivaten wurden stickstoffreie Testracemate geprüft.



25

	R
a	H
b	CH_3
c	$COCH_3$

Optische Ausbeute:

Derivat 25 a und 25 b wurden am Cellulosetriacetat zu 42 % und 14,6 % angereichert. Racemat 25 c wurde mit 82,8 % besonders hoch aktiviert.

Stereoselektivität:

Die Stereoselektivität ist in der Reihe der Benzoinderivate unterschiedlich. Verbindung 25 a und 25 b wurde unter bevorzugter Retention des (S)-Enantiomeren eluiert. Bei Racemat 25 c ist der zurückgehaltene Antipode (R)-konfiguriert.

Tabelle 7: Trennergebnisse der Benzoinderivate 25 a - c

Racemat	Ag CTA	K	Ag Polyamid	Adsorbens
a	42	S	22,4	2
b	14,6	S	5,1	6
c	82,8	R	8,3	6

Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

Alle drei getesteten Benzoinderivate wurden am Cellulosetriacetat höher als an den Polyamiden angereichert. Besonders signifikant ist die unterschiedliche Aktivierung des Benzoinacetates (25 c).

Allgemein kann für die ausgewählten Testracemate festgestellt werden, daß sich die beiden Trennprinzipien auf Grund des unterschiedlichen Adsorptionsmechanismus in günstiger Weise ergänzen. Racemate, die an einem Säulentyp schlecht aktiviert werden, liefern meist am anderen bessere Ergebnisse.

III. Chromatographie von Arzneistoffen und Arzneistoffvorstufen an Cellulosetriacetat

Nach den erfolgreichen Versuchen mit Testracematen sollte das Cellulosetriacetat nun auch zur Racemattrennung von Arzneistoffen eingesetzt werden. Es wurden bevorzugt Pharmaka mit Amid- und Imidstrukturen untersucht, da sie mit konventionellen Methoden schwer trennbar sind und Vergleichsdaten für die Anreicherung an Polyamidgelen vorlagen.

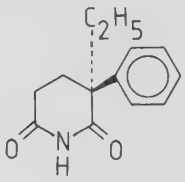
Ausgewählt wurden racemische Arzneistoffe aus den Substanzklassen

Piperidindione
Hydantoine
Succinimide
Barbiturate
Cyanessigester
weitere Pharmaka

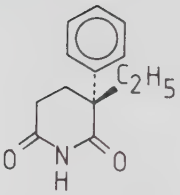
Die Chromatographieversuche der Arzneistoffe wurden unter denselben Versuchsbedinungen wie bei den Testracematen durchgeführt.

1. Piperidindione:

a) Glutethimid (Doriden®)



9a



9b

(S)-(-)-3-Ethyl-3-phenyl-2,6-piperidindion (9a)
(R)-(+)-3-Ethyl-3-phenyl-2,6-piperidindion (9b)

Racemisches Glutethimid findet als Hypnoticum Verwendung. Seine Wirkung ähnelt dem Phenobarbital. Gleichzeitig besitzt es anticholinerge Wirksamkeit.

Die Enantiomeren des Glutethimids sind durch stereoselektive Synthese zugänglich[26]. Optisch reines 2-Ethyl-2-phenyl- glutarsäurenitril wird durch Racematspaltung mit Brucin hergestellt und durch Ringschlußreaktion zu den beiden Isomeren 9a und 9b umgesetzt. Die absolute Konfiguration ist ebenfalls geklärt[27].

Im pharmakologischen Test wurde ein zwei- bis dreimal stärkerer zentralhemmender Effekt des (R)-Antipoden im Vergleich zum (S)-Antipoden festgestellt[28, 29]. Die Metabolisierung verläuft stereoselektiv. (R)-Glutethimid wird in 4- bzw. 5-Stellung des Piperidinringes hydroxyliert und nach Kopplung an Glucuronsäure ausgeschieden. Die Ethylgruppe des (S)-Glutethimids wird entweder vollständig abgebaut oder ebenfalls nach Hydroxylierung als Etherglucuronid ausgeschieden.

Optische Ausbeute:

Die Glutethimidisomeren konnten am Cellulosetriacetat zu 86,7 % nach einmaligem Durchlauf durch die Säule aktiviert werden (Abb. 3 auf Seite 104).

Stereoselektivität:

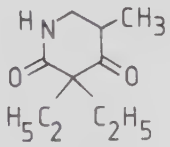
Die Elution erfolgte unter stärkerer Retention des (R)-konfigurierten Enantiomeren.

Vergleich der beiden Adsorbentientypen:

Ag	Cellulosetriacetat	: 86,7 %
Ag	Polyamid 5	: 24,7 %

Zur Aktivierung dieses racemischen Arzneistoffes ist das Cellulosetriacetat allen Polyamiden überlegen.

b) Methyprylon (Noludar^{R})



26

3, 3-Diethyl-5-methyl-2, 4-piperidindion

Das Hypnotikum Methyprylon (Noludar^{R}) war konventionell nur durch 400 malige Kristallisation von 20 kg Ausgangsmaterial mit einer Ausbeute von weniger als 0, 05 % in optisch aktiver Form zu erhalten [30]. Die absolute Konfiguration der Enantiomere ist nicht bekannt. Nach pharmakologischen Untersuchungen ist der (+)-Enantiomer wirksamer als der (-)-Enantiomer [31].

Optische Ausbeute:
Obwohl dieses Racemat durch das Fehlen eines Aromaten keine günstigen Voraussetzungen für eine erfolgreiche Spaltung am Cellulosetriacetat bot, wurde dennoch eine Anreicherung von 22, 7 % erzielt.

Stereoselektivität:

Der (-)-Antipode wird bevorzugt adsorbiert.

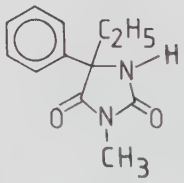
Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

Ag	Cellulosetriacetat	: 22,7 %
Ag	Polyamid 2	: 35,5 %

Für beide Säulentypen findet man ein ähnlich hohes Trennergebnis.

2. Hydantoine

Mephenytoin (Mesantoin^{R})



27

(R, S)-3-Methyl-5, 5-phenylethyl-2, 4-dioxoimidazolidin

Racemisches Nirvanol war mit Brucin über diastereomere Salze in seine optischen Isomeren zerlegt [32] und zu (+)- und (-)-Mephenytoin methyliert worden [33].

Mephenytoin ist ein stark wirkendes Antiepileptikum mit schwach sedierender Komponente. Nach Desmethylierung im Organismus stellt Nirvanol die eigentliche Wirksubstanz dar. Das (-)-Isomer des Mephenytoins wird schneller verstoffwechselt und zeigt eine stärkere Wirkung als die (+)-Form [34, 35].

Optische Ausbeute:

Cellulosetriacetat trennte den Arzneistoff mit einer optischen Ausbeute von 67,7 % auf.

Stereoselektivität:

Da die absolute Konfiguration des Mephenytoins nicht bekannt ist, werden zur Beschreibung der stereoselektiven Adsorption die Drehrichtungen herangezogen. Es wurde das (-)-Isomere stärker retiniert.

Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

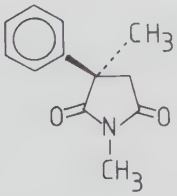
Ag	Cellulosetriacetat	: 67,7 %
Ag	Polyamid 1	: 54,7 %

Zur Aktivierung des Mephenytoins eignen sich beide Adsorbenstypen gleichermaßen.

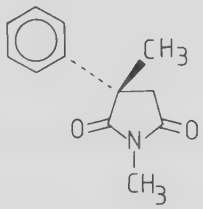
3. Succinimide

Substanzen dieser Stoffklasse werden zur Behandlung von Petit-mal-Epilepsien angewendet. Der stereoselektive Syntheseweg [36] ging von optisch aktiven Bernsteinsäurehalbnitrilen aus. Nach Veresterung und Umsetzung zu Esteramiden erfolgte der Ringschluß zu den Succinimiden. Die absolute Konfiguration [37] wurde durch chemische Korrelation mit den entsprechend substituierten Cyanessigestern spektralphotometrisch geklärt. Die entsprechenden Untersuchungen waren beim Ethosuximid nicht möglich.

a) Mesuximid (Petinutin^{R})



28a



28b

(S)-(-)-2-Phenyl-2-methyl-N-methylsuccinimid (28a)

(R)-(+)-2-Phenyl-2-methyl-N-methylsuccinimid (28b)

Optisch Ausbeute:

Triacetylcellulose trennte das Pharmakon zu 86,9 % auf.

Stereoselektivität:

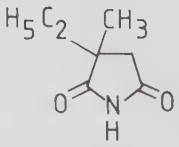
Die Aktivierung erfolgte unter bevorzugter Adsorption des (S)-konfigurierten Enantiomeren.

Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

Ag	Cellulosetriacetat	: 86,9 %
Ag	Polyamid 4	: 6,4 %

Die Chromatographie des Mesuximids ergab sehr unterschiedliche Resultate. Eine Anreicherung an Polyamidadsorbentien konnte entweder nicht festgestellt werden oder war sehr gering. Durch N-Methylierung fällt die Wasserstoffdonatoreigenschaft des Stickstoffes weg und der Sorptionsmechanismus der Polyamidgele wird gestört. Die Aktivierung am Cellulosetriacetat war hingegen sehr hoch.

b) Ethosuximid



29

(R, S)-2-Ethyl-2-methylsuccinimid

Optische Ausbeute:

Die Elution der Substanz erfolgte ohne meßbare Anreicherung in wenigen Fraktionen.

In der Substanzklasse der Succinimide erweist sich der Aromat in unmittelbarer Nähe des Chiralitätszentrums als essentiell. Vermutlich reicht die

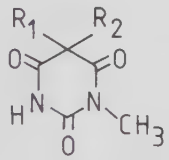
Imidstruktur als adsorptiv wirksame Gruppe allein nicht aus. Beim Ethosuximid beeinträchtigen die geringen Größenunterschiede der Substituenten am Asymmetriezentrum zusätzlich die stereoselektive Einpassung in die Matrixnischen.

Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

Dieser Arzneistoff wurde von allen getesteten Adsorbentien kaum getrennt.

4. Barbiturate

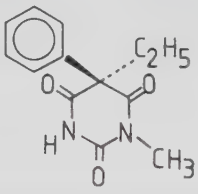
Barbitursäuren sind symmetrisch gebaut, auch wenn sie am C_5 zwei verschiedene Substituenten tragen. Das unterschiedlich substituierte Kohlenstoffatom C_5 wird aber zum Chiralitätszentrum, wenn man den Wasserstoff eines Ringstickstoffes durch eine Alkylgruppe ersetzt.



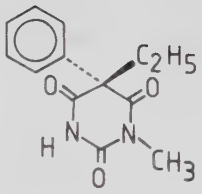
Präparate dieses Typs sind zum Beispiel das 1932 als erstes intravenöses Narkotikum eingeführte Hexobarbital und das Methylphenobarbital.

Barbiturate sind in der Regel sedativ hypnotisch, in höherer Dosierung narkotisch wirksam. Sie werden als Racemate verwendet.

a) Methylphenobarbital (Prominal R)



30a



30b

(R)-(-)-1-Methyl-5, 5-phenylethylbarbitursäure (30a)
(S)-(+)-1-Methyl-5, 5-phenylethylbarbitursäure (30b)

Die Spaltung von Methylphenobarbital über diastereomere N-Methylchininium salze [38] und die stereoselektive Synthese gelang Knabe und Mitarbeitern [39].

Ausgehend von disubstituierten optisch aktiven Cyanessigestern wurde durch Kondensation mit N-Methylharnstoff über die (-)-Iminoverbindung (-)-Methylphenobarbital und durch Kondensation mit Dicyandiamid über die (-)-Cyandiiminoverbindung nach Methylierung der sekundären Amidgruppe und anschließender Hydrolyse (+)-Methylphenobarbital erhalten. Die optische Reinheit der erhaltenen Enantiomere überprüfte man mit der Isotopenverdünnungsanalyse. Der gleiche Arbeitskreis konnte auch die absolute Konfiguration der Isomeren klären [40].

Der (R)-Antipode des Methylphenobarbitals ist stärker narkotisch wirksam als der (S)-konfigurierte Antipode [41].

Betrachtet man die Chromatographieergebnisse des Mephenytoins, Mesuximids und besonders des Glutethimids, so sollte der Barbituratring mit drei zusätzlichen sorptionsfähigen Carbonylgruppen und einem unsubstituierten Phenylrest am Asymmetriezentrum eine besonders geeignete Struktur für das Cellulosetriacetat darstellen.

Optische Ausbeute:

Tatsächlich erhielt man zwei weit auseinanderliegende Enantiomerenpeaks. Das substanzfreie Zwischenvolumen betrug 720 ml. Die unterschiedliche Stabilität der beiden diastereomeren Adsorbate und damit die Stereoselektivität der Säule ist bei dieser vollständigen Trennung besonders groß. Der Trennfaktor α betrug 2,3 und die Auflösung R_S = 2,3.

Stereoselektivität:

Der (S)-Enantiomer wird retiniert und unter starkem Tailing eluiert (Abb. 10).

Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

Ag Cellulosetriacetat : 100 %
Ag Polyamid 6 : 10,1 % (nur für Adsorbens 6 berechnet)

Cellulosetriacetat stellt das ideale Adsorbens zur Trennung von Methylphenobarbital dar.

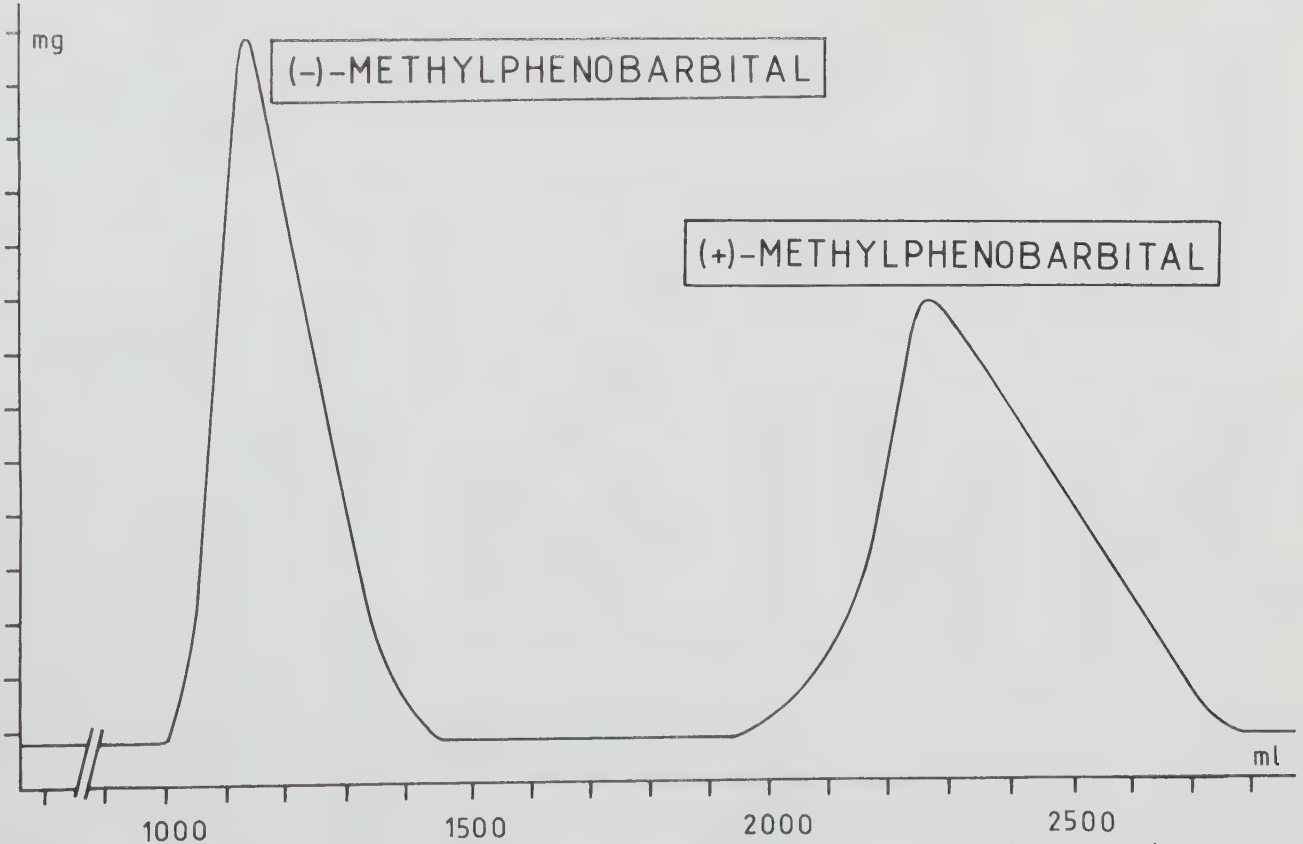
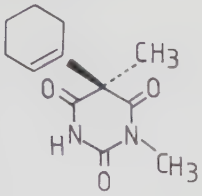
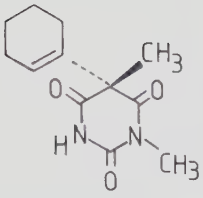


Abb. 10: Chromatographie von 301 mg Methylphenobarbital (30) an Cellulosetriacetat (85 x 2, 5 cm)
Elutionsmittel: 95 % ETOH

b) Hexobarbital (Evipan ^{R})



31a



31b

(R)-(-)-1, 5-Dimethyl-5-cyclohexenyl-barbitursäure (31 a)
(S)-(+)-1, 5-Dimethyl-5-cyclohexenyl-barbitursäure (31 b)

Die Enantiomerentrennung über diastereomere Salze [42], stereoselektive Synthese [39, 43] und Aufklärung der absoluten Konfiguration [40] des Hexobarbitals wurden analog zu der des Methylphenobarbitals durchgeführt.

Beim Hexobarbital besitzen die Enantiomeren neben einer unterschiedlichen Wirksamkeit auch eine verschiedene Pharmakokinetik. Der mehrfach stärker narkotisch wirksame (S)-Enantiomer wird anders verteilt und rascher metabolisch inaktiviert als der (R)-Enantiomer [44-48].

Optische Ausbeute:

Die Chromatographie dieses racemischen Arzneistoffes ergab ebenfalls eine vollständige Aufspaltung in die beiden Isomeren (Abb. 11).

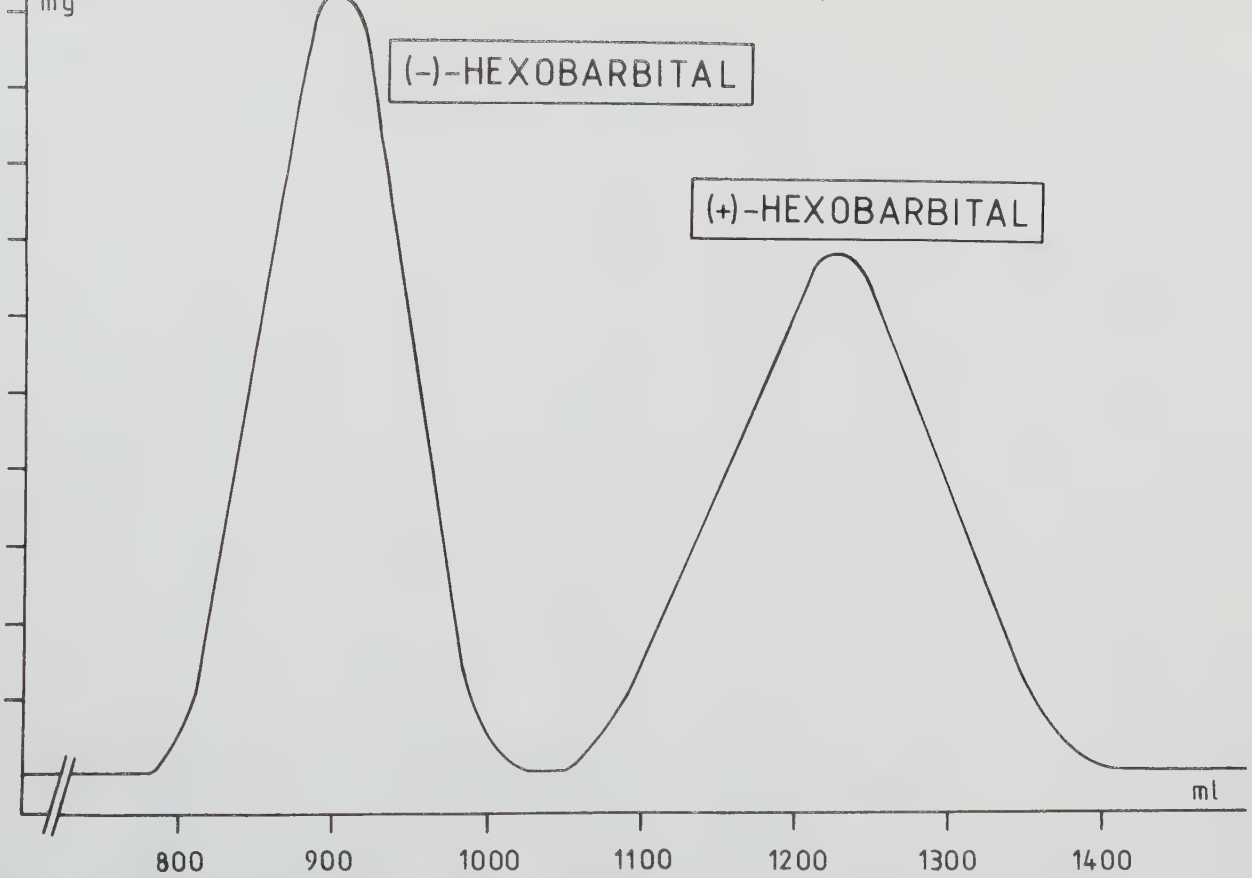


Abb. 11 : Chromatographie von 160,6 mg Hexobarbital (31) an 205 g Cellulosetriacetat (85 x 2,5 cm)
Elutionsmittel : 95 % ETOH

Dieser Versuch hat gezeigt, daß bei zusätzlich adsorptiv wirksamen funktionellen Gruppen, eingebaut in ein Ringsystem, ein Aromat zur Erzielung einer vollständigen Racemattrennung nicht unbedingt erforderlich ist. Der Sechsring des Cyclohexenylsubstituenten scheint zur Komplexierung gleichfalls eine optimale Größe zu besitzen. Der Trennfaktor α betrug 1,7; die Auflösung R_S = 1,5.

Stereoselektivität:

Die Stereoselektivität entsprach der des Methylphenobarbitals. Der (S)-Enantiomer wurde stärker zurückgehalten.

Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

Ag Cellulosetriacetat : 100 %
Ag Polyamid 2 : 28,8 %

Zur chromatographischen Racemattrennung von Hexobarbital ist wiederum Cellulosetriacetat besonders geeignet.

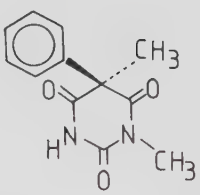
Um den Einfluß der Substituenten an C_5 der chiralen Barbiturate zu untersuchen, wurde noch eine Reihe von Derivaten getestet:

C_5 Phenyl/aliphatisch substituierte Barbiturate
C_5 Cyclisch/aliphatisch substituierte Barbiturate
di - aliphatisch substituierte Barbiturate

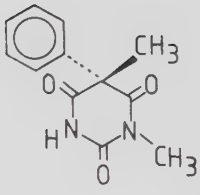
Alle N-methylierten Barbiturate sind nach Knabe durch Synthesen aus optisch aktiven Vorstufen zugänglich, die Enantiomeren zeigen stereoselektive pharmakodynamische Unterschiede. Unabhängig von der chemischen Struktur des cyclischen Substituenten am C_5 ist das (+)-(S)-Enantiomer narkotisch wirksamer, wenn der aliphatische Rest an C_5 eine Methylgruppe ist. Im Falle einer Ethylsubstitution trifft das Umgekehrte zu[49].

Diese racemischen Barbitursäuren wurden freundlicherweise von Prof. Knabe zur Verfügung gestellt.

c) Methyleudan



32a



32b

(R)-(-)-1-Methyl-5, 5 phenylmethylbarbitursäure (32 a)
(S)-(+)-1-Methyl-5, 5 phenylmethylbarbitursäure ((32 b)

Optische Ausbeute:

Mikrokristallines Cellulosetriacetat trennte racemisches Methyleudan ebenfalls quantitativ auf. Die Elutionskurven lagen wie erwartet weit auseinander. Zur Beschleunigung der Chromatographie wurde, nachdem der (-)-Enantiomer eluiert war, das Adsorbens auf 40° C erwärmt. Es verblieb trotz erhöhter Temperatur ein substanzfreies Volumen von 440 ml zwischen den Isomerenpeaks. Auf Grund der Temperaturerhöhung ist die Angabe von Trennfaktor α und R_S-Wert nicht sinnvoll (Abb. 12).

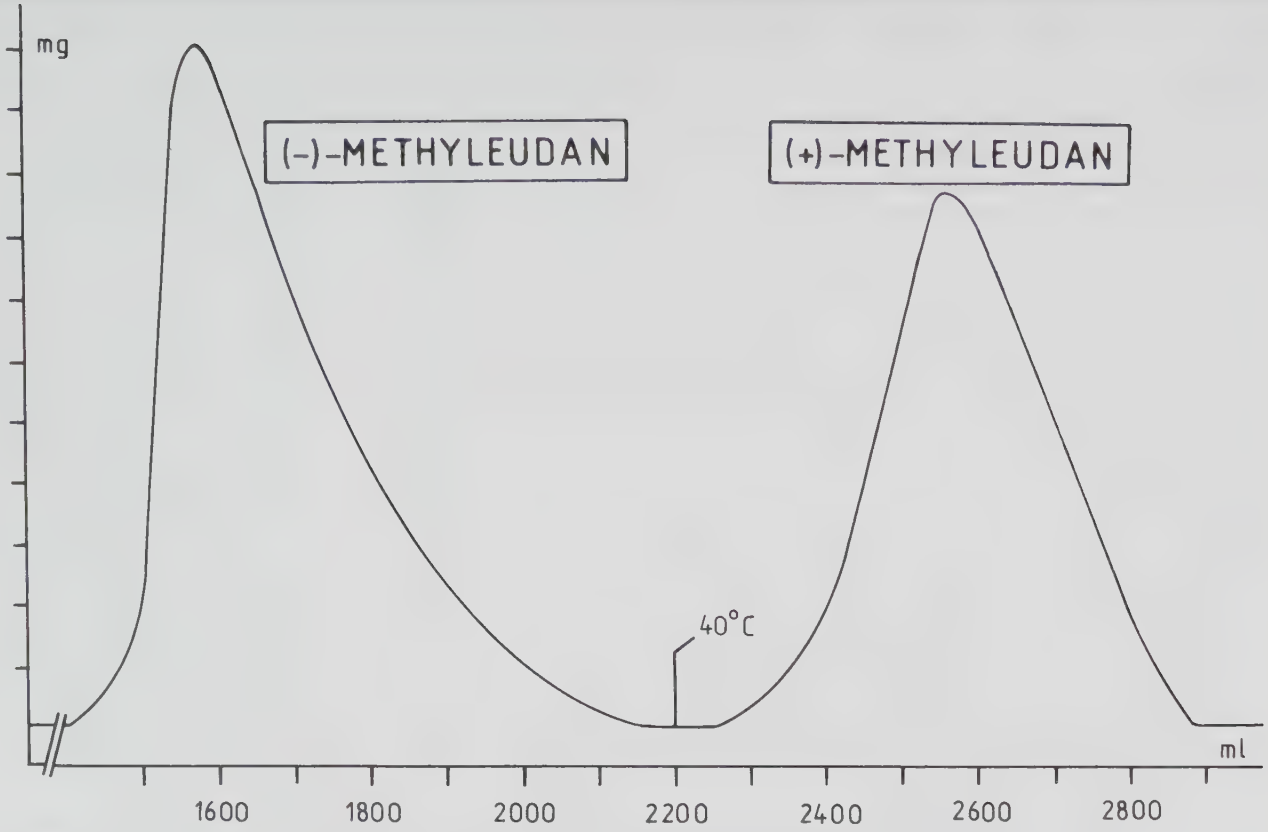


Abb. 12 : Chromatographie von 160 mg Methyleudan (32) an 205 g Cellulosetriacetat (85 x 2, 5 cm)
Elutionsmittel : 95 % ETOH

Die großen Retentionsvolumina des Methylphenobarbitals und des Methyleudans sprechen für einen zweifachen Sorptionsmechanismus. Das Molekül wird am Phenylring und an den Imidgruppen in den aktiven Zentren des Adsorbens verankert.

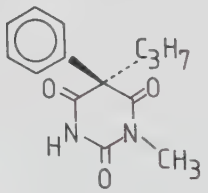
Stereoselektivität:

Das (S)-konfigurierte Isomere wurde bevorzugt retiniert.

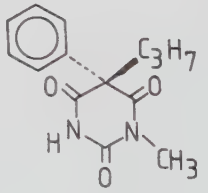
Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

Für Methyleudan und die folgenden Barbiturate lagen keine Vergleichsdaten an Polyamiden vor.

d) Als weitere phenylsubstituierte Barbitursäure wurde ein Derivat mit einer voluminösen Propylkette an C_5 chromatographiert.



33a



33b

(R)-(-)-1-Methyl-5, 5-phenylpropylbarbitursäure (33 a)
(S)-(+)-1-Methyl-5, 5-phenylpropylbarbitursäure (33 b)

Optische Ausbeute:

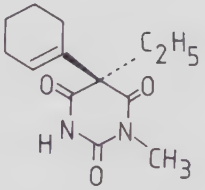
Die optische Ausbeute sank auf 47, 5 %. Offensichtlich wird durch Verlängerung des Alkylsubstituenten um ein Kohlenstoffatom die Einpassung der Moleküle in die Hohlräume gestört. Während die Methyl- und Ethylverbindung zu 100 % aktiviert worden sind, beobachtete man beim Propylderivat eine Art Ausschlußeffekt. Auch das Retentionsvolumen sank auf die Hälfte. Durch den größeren Raumbedarf der Propylgruppe wird nicht mehr das Gesamtmolekül in der chiralen Matrix komplexiert.

Stereoselektivität:

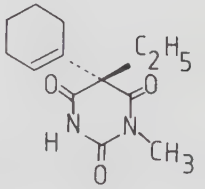
Der (S)-konfigurierte Antipode wurde verstärkt zurückgehalten.

e) Aus der Gruppe der cyclisch-aliphatisch substituierten Barbiturate chromatographierte man nun das entsprechende Ethylderivat des Hexobarbitals.

Methylcyclobarbital



34a



34b

(R)-(-)-1-Methyl-5, 5-cyclohexenylethylbarbitursäure (34 a)
(S)-(+)-1-Methyl-5, 5-cyclohexenylethylbarbitursäure (34 b)

Optische Ausbeute:

Das Racemat wurde wiederum vollständig in die Enantiomeren zerlegt (Abb. 13).

200 ml substanzfreies Volumen lag zwischen den Elutionskurven der Antipoden. Der Trennfaktor α betrug 2, die Auflösung $R_S = 1,7$.

Die Ethylgruppe erwies sich auch in Kombination mit dem gewinkelten Cyclohexenylrest noch als optimal inkludierbar.

Stereoselektivität:

Der (S)-Antipode wird stärker adsorbiert.

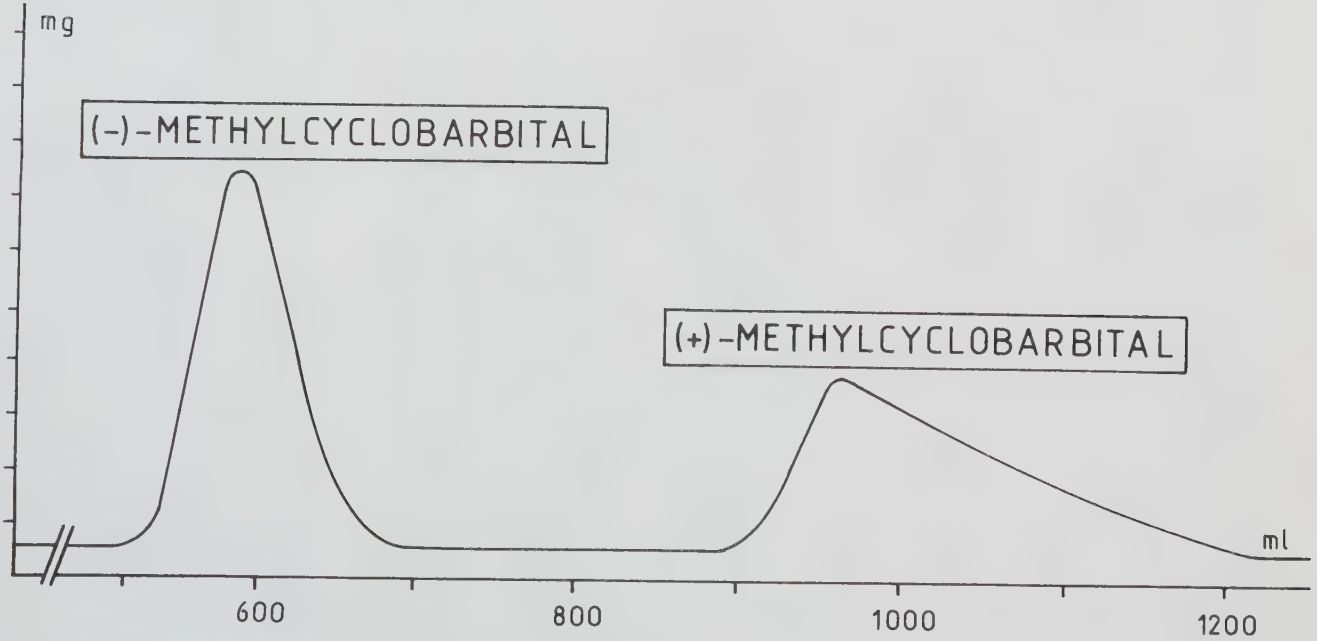
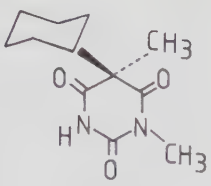
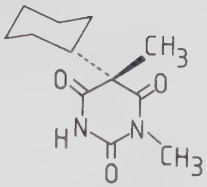


Abb. 13 : Chromatographie von 208, 7 mg Methylcyclobarbital (34) an 205 g Cellulosetriacetat (85 x 2, 5 cm)
Elutionsmittel : 95 % ETOH

f) Die methyl- und ethylsubstituierten voll hydrierten cyclischen Barbiturate wurden getestet, um den Einfluß der Doppelbindung beschreiben zu können.



35a



35b

(R)-(-)-1, 5-Dimethyl-5-cyclohexylbarbitursäure (35 a)
(S)-(+)-1, 5-Dimethyl-5- cyclohexylbarbitursäure (35 a)

Optische Ausbeute :

Die Triacetylcellulose aktivierte auch dieses Racemat vollständig (Abb. 14). Der Trennfaktor α betrug 1, 9; die Auflösung R_S = 1, 5

Stereoselektivität :

Der (S)-Enantiomer wird bevorzugt retiniert.

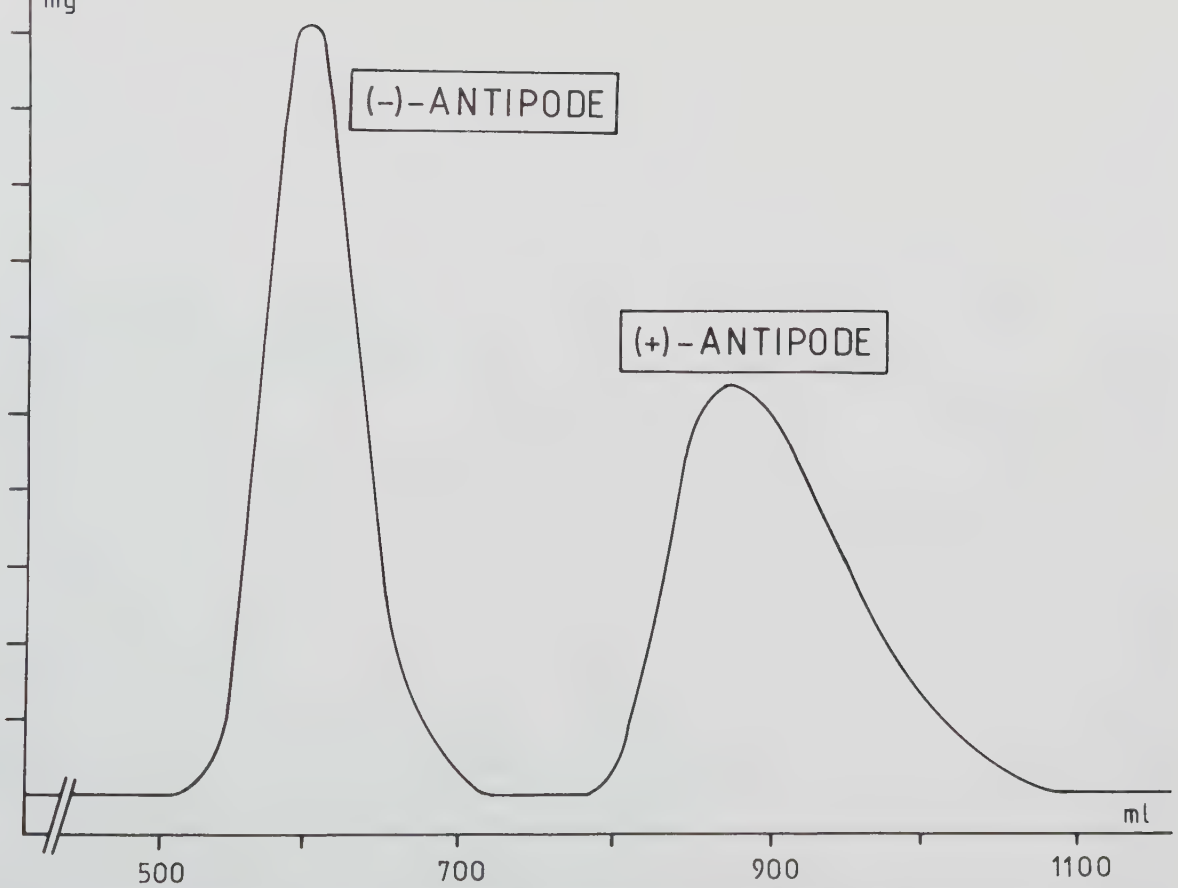
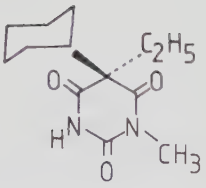
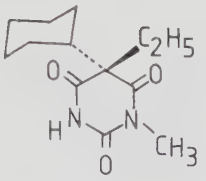


Abb. 14 : Chromatographie von Dimethylcyclohexylbarbitursäure (35) an 205 g Cellulosetriacetat (85 x 2, 5 cm)
Elutionsmittel: 95 % ETOH

g)



36a



36b

(R)-(-)-1-Methyl-5, 5-cyclohexylethylbarbitursäure (36 a)
(S)-(+)-1-Methyl-5, 5-cyclohexylethylbarbitursäure (36 b)

Optische Ausbeute:

Dieses Barbiturat wurde ebenfalls quantitativ gespalten (Abb. 15). Der Trennfaktor α betrug 2,4; die Auflösung R_S = 1,7.

Stereoselektivität:

Der (S)-Antipode wird bevorzugt zurückgehalten.

Eine Doppelbindung im cyclischen Substituenten hat keinen Einfluß auf den Inklusionsmechanismus. Wie aus den chromatographischen Daten zu ersehen ist, verhalten sich die vier geprüften Derivate Hexobarbital, Methylcyclobarbital, Cyclohexylmethyl- und Cyclohexylethyl-N-methylbarbitursäure gegenüber dem Cellulosetriacetatgel sehr ähnlich. Die fast identischen Retentionsvolumina, die gleiche Stereoselektivität und schließlich die quantitative Aktivierbarkeit deuten auf eine einheitliche, in gewissen Grenzen jedoch flexible Fixierung der Enantiomeren in der chiralen Matrix hin. Die geringeren Retentionszeiten, verglichen mit Methylphenobarbital und Methyleudan sind mit dem Fehlen der intensiven Aromateninklusion zu erklären.

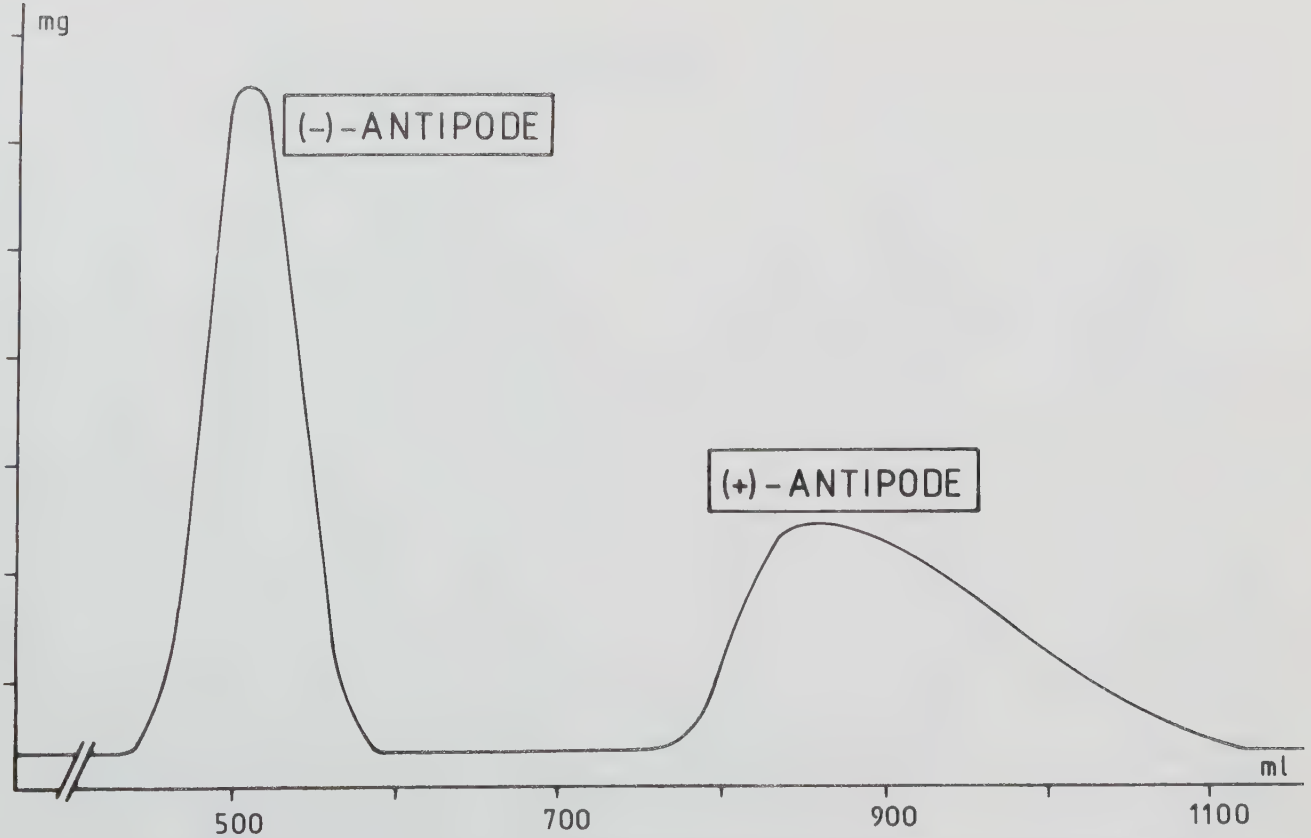
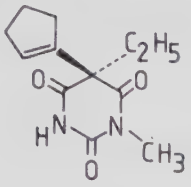
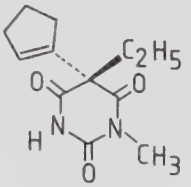


Abb. 15 : Chromatographie von Methylcyclohexylethylbarbitursäure (36) an 205 g Cellulosetriacetat (85 x 2, 5 cm)
Elutionsmittel : 95 % ETOH

h) Ein Barbitursäurederivat mit cyclischem Fünfring sollte das Ausmaß dieser Variationsmöglichkeit zeigen.



37a



37b

(R)-(-)-1-Methyl-5, 5-cyclopentenyl-ethylbarbitursäure (37 a)
(S)-(+)-1-Methyl-5, 5-cyclopentenyl-ethylbarbitursäure (37 b)

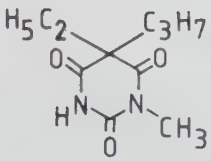
Optische Ausbeute:

Die optische Ausbeute betrug 68, 2 %. Cellulosetriacetat besitzt jedoch auch für diese Barbitursäure noch gute Trenneigenschaften.

Stereoselektivität:

Auch hier wurde bevorzugt der (S)-Enantiomer zurückgehalten. Geht man jedoch zu Derivaten über, die an C_5 mit zwei aliphatischen, kleinen Resten substituiert sind, geht die stereoselektive Komplexierungsfähigkeit der Triacetylcellulose verloren.

i)

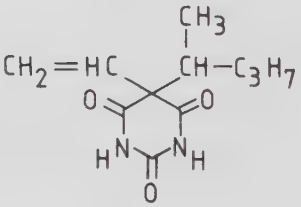


38

(R, S)-1-Methyl-5, 5-propylethylbarbitursäure

Das Racemat wird ohne Anreicherung rasch eluiert. Das Retentionsvolumen ist etwas geringer als bei den cyclisch substituierten Racematen. Der Barbituratring wird nur noch unspezifisch gebunden. Vermutlich ist der Größenunterschied zwischen Ethyl- und Propylgruppe zu gering, um eine stereoselektive Adsorption zu ermöglichen.

j) Als letztes Barbitursäurederivat wurde Vinylbital getestet.



39

Vinylbital (Speda^{R})

(R, S)-5-Vinyl-5-(1'-methyl-n-butyl)barbitursäure

Die Spaltung von Vinylbital in seine optische Isomeren war von Knabe über die fraktionierte Kristallisation der N-Methylchininiumsalze durchgeführt worden[38, 50].

Die Substanz wurde ebenfalls ohne meßbare Aktivierung eluiert.

Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

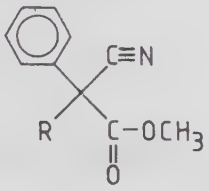
An Polyamid 2 wurde das Racemat nur zu 8, 8 % angereichert. Da sich das Chiralitätszentrum in der Seitenkette befindet, muß die mangelnde Aktivierbarkeit an allen Säulen auf den größeren Abstand zu den adsorptiv wirksamen Gruppen zurückgeführt werden.

Zusammenfassung der Trennergebnisse der Barbiturate:

Cellulosetriacetat erwies sich als ideales Adsorbens zur chromatographischen Trennung einiger racemischer Barbitursäuren. Sechs der zehn getesteten Derivate wurden quantitativ getrennt. Die Barbiturate 33 und 37 wurden mittelmäßig angereichert, jedoch noch höher aktiviert als das beste für Hexobarbital gefundene Ergebnis am Polyamid. Die Derivate 38 und 39 konnten nicht aktiviert werden.

5. Cyanessigsäuremethylester

Nach diesen erfolgreichen Chromatographieversuchen der racemischen Barbitursäuren sollten nun auch die Cyanessigsäureester, Synthesevorstufen chiraler Barbiturate und anderer Pharmaka wie optisch aktiver 3,5-Pyrazolidindione, auf Spaltbarkeit am Cellulosetriacetat geprüft werden. Ausgewählt wurden phenylsubstituierte Derivate unter Variation der Kettenlange des zweiten Substituenten am Asymmetriezentrum.



40

	R
a	CH_3
b	C_2H_5
c	C_4H_9

Die reinen Spiegelbildisomeren wurden ebenfalls von Knabe [39] erhalten. Man ging von den durch Verseifung der entsprechenden Ester hergestellten disubstituierten Cyanessigsäuren aus. Die Racematspaltung wurde über diastereomere Salze mit Threobase = threo-1-Phenyl-2-amino-propandiol-(1,3) durchgeführt. Anschließend wurde wieder mit Diazomethan verestert. Die

Ausbeuten an optisch aktivem Material waren jedoch schlecht, da die Cyanessigsäuren beim Umkristallisieren leicht decarboxylieren. Auf Grund dieser Tatsache war eine präparative chromatographische Racemattrennung der stabilen Ester besonders interessant.

Optische Ausbeute:

Die Chromatographie des Phenylmethylcyanessigesters (40a) ergab eine quantitative Enantiomerentrennung. Das Volumen zwischen den Elutionskurven der beiden Antipoden betrug 160 ml.

Die Trennung der entsprechenden Ethylverbindung 40b verlief ebenfalls noch vollständig. Die Elutionskurven beider Isomerer berühren sich. Die Photometerkurve zeigt jedoch bis zur Basislinie zwei separate Massenpeaks.

Beim Übergang zur Butylverbindung 40c überschneiden sich die Elutionskurven und es treten Mischfraktionen auf. Cyanessigester 40c konnte nur noch mit einer optischen Ausbeute von 36,4 % aktiviert werden (Abb. 16).

Stereoselektivität:

Wie bei den Barbitursäuren wurde stets der (S)-Antipode bevorzugt retiniert.

Tabelle 8: Trennergebnisse der Cyanessigsäuremethylester 40a - c

Racemat	Ag	K	Trennf. α	R_S
a	100	S	1,8	1,6
b	100	S	1,5	1,0
c	36,4	S	-	-

Mit wachsender Kettenlänge des Alkylsubstituenten nimmt die Trennleistung des Adsorbens gegenüber den racemischen Cyanessigsäuremethylestern ab. Analog zur Phenylpropylbarbitursäure findet man auch hier beim Butylderivat ein Absinken der Trennleistung.

Die chromatographische Racemattrennung am Cellulosetriacetat stellt bei geeigneter Substitution der Cyanessigester eine brauchbare Alternative zur schwierigen konventionellen Spaltung dieser Racemate dar.

An Polyamiden wurde diese Substanzklasse nicht chromatographiert, da aus Vorversuchen bekannt war, daß Mandelsäureester mit der Fließmittelfront unaktiviert eluiert werden. Die Methyl-, Ethyl-, Isopropyl- und tert-Butylester der Mandelsäure waren am Cellulosetriacetat zu 40 - 20 % aufgetrennt worden [51].

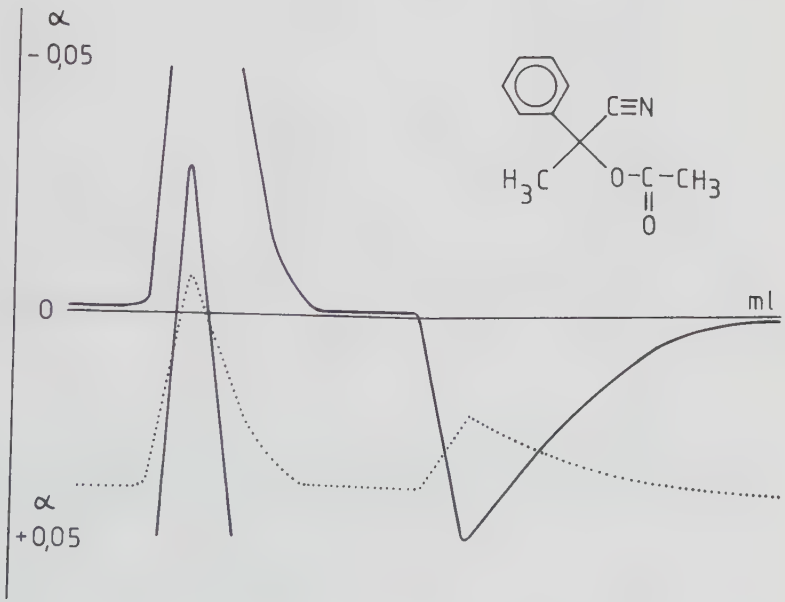


Abb. 16 : Drehwertmassendiagramme der Cyanessigsäureethylester 40a - c an 205 g Cellulosetriacetat (85 x 2,5 cm)
Elutionsmittel: 95 % ETOH

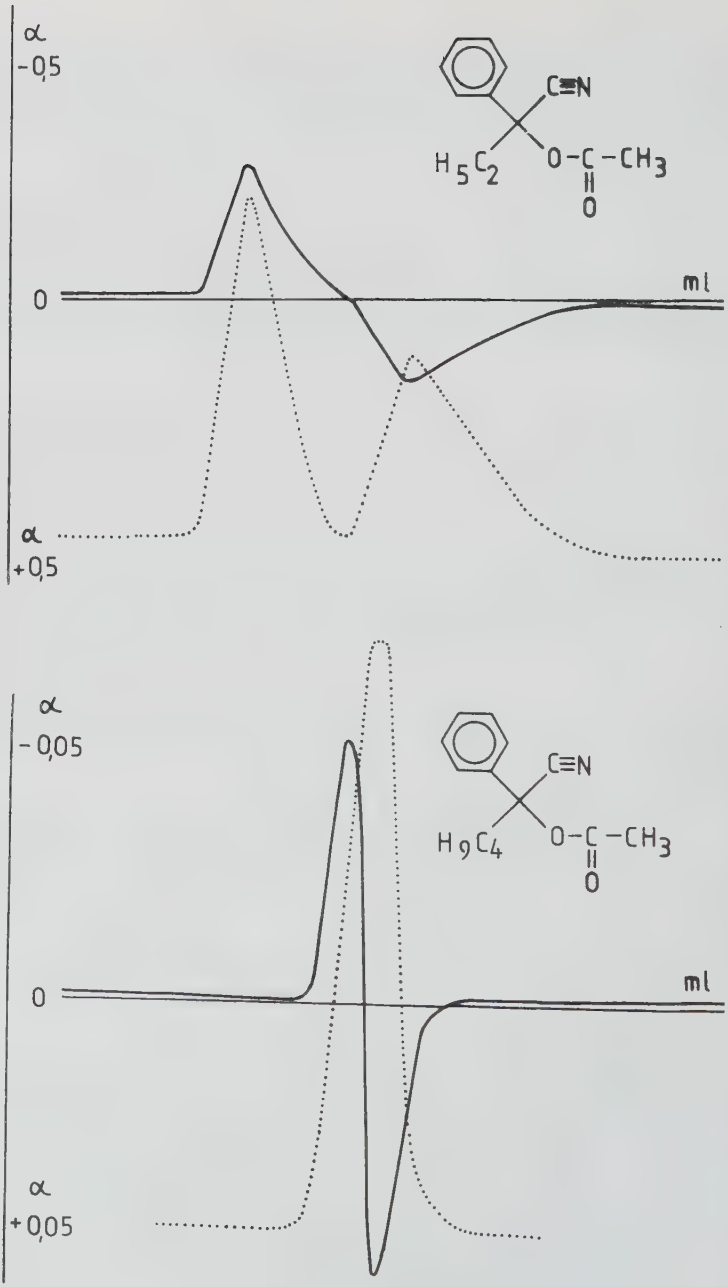
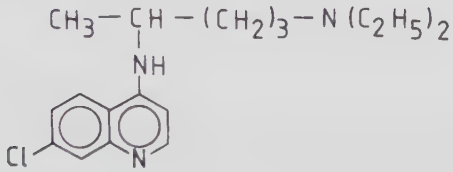


Abb. 16

6. Weitere Pharmaka

Die Eignung mikrokristallinen Cellulosetriacetates zur Racemattrennung von Pharmaka wurde noch stichprobenartig an anderen Arzneistoffgruppen geprüft.

a) Chloroquin (Resochin^{R})



41

(R, S)-7-Chlor-4-(4diethylamino-1-methyl-butylamino)-chinolin

Das Antimalariamittel Chloroquin, konventionell trotz der basischen Gruppierung nicht trennbar, ist durch mühsame wiederholte Racemattrennung am Phenylalaninadsorbens in die optisch reinen Antipoden zerlegt worden[12]. (+)-Chloroquin ist gegen Malaria stärker wirksam und gleichzeitig weniger toxisch[52, 53].

Optische Ausbeute:

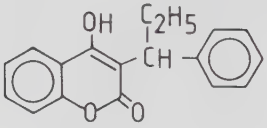
Die Chromatographie des Chloroquins am Cellulosetriacetat ergab keine Anreicherung. Die Retentionszeit der Substanz entspricht dem Totvolumen der Säule. Der in 7-Stellung chlorsubstituierte Heterocyclus wird nicht inkludiert.

Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

Ag Cellulosetriacetat : 0 %

Ag Polyamid 1 : 18,7 % (berechnet unter Zugrundelegung des später ermittelten $[\alpha]_{589} = 108^{o}$ (ETOH)).

b) Phenprocoumon (Marcumar^{R})



11

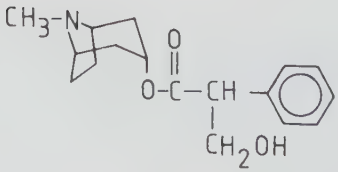
Optische Ausbeute:

Das Molekül des Phenprocoumons ist ebenfalls zu groß, um die optisch aktiven Zentren der Acetylcellulose besetzen zu können. Obwohl das Racemat einen unsubstituierten Aromaten am Chiralitätszentrum trägt und somit günstige Voraussetzungen für eine Racematspaltung mitbringt, wird es ohne Aktivierung eluiert.

Vergleich der Adsorbenstypen:

Ag	Cellulosetriacetat	: 0 %
Ag	Polyamid 1	: 19,7 %

c) Atropin



42

Der (S)-Enantiomer, das Hyoscyamin,besitzt eine 15 - 20 mal größere parasympatholytische Wirkung als (R)-Hyoscyamin.

Optische Ausbeute:

Atropin wurde am Cellulosetriacetat zu 38,4 % aktiviert. Allerdings wurde die Substanz nicht vollständig eluiert. Die ähnlich hohe Anreicherung des Tropasäureamids (31,3 %) spricht für ausschließliche Komplexierung des Atropins an der aromatischen Estergruppierung.

Stereoselektivität:

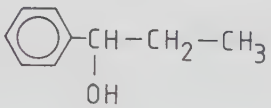
(R)-Hyoscyamin wurde bevorzugt komplexiert.

Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

Ag	Cellulosetriacetat	: 38,4 %
Ag	Polyamid 5	: 4,4 %

Als Ester wird Atropin wiederum nur am Cellulosetriacetat mit brauchbar hoher Anreicherung aktiviert.

d)



43

1-Phenyl-1-propanol

1-Phenyl-1-propanol befindet sich unter dem Warennamen Felicur^{R} als Choleretikum im Handel.

Optische Ausbeute:

Die Substanz wird durch die aromatische Haftgruppe nur unspezifisch von der Säule zurückgehalten. Dieser Versuch bestätigt die von Hesse bereits getroffene Aussage, daß OH-Funktionen bei der chromatgraphischen Racemattrennung an kristallinem Cellulosetriacetat als ungünstige Reste anzusehen sind, besonders dann, wenn sie die einzigen funktionellen Gruppen darstellen.

Vergleich der beiden Adsorbenstypen:

Dieser Arzneistoff konnte auf keinem der beiden Säulentypen gespalten werden.

Für die Arzneistoffe Chlorthalidon, Oxazepam und Thalidomid erhielt man die besten Trennergebnisse an Polyamidadsorbentien. Alle drei Stoffe wurden quantitativ gespalten. Diese leicht racemisierenden Substanzen können am Cellulosetriacetat in wäßrigen Fließmitteln nicht chromatographiert werden.

Tabelle 9: Trennergebnisse an Polyamidadsorbentien

Racemat	Ag Polyamid	Adsorbens
Chlorthalidon (14)	100	1
Oxazepam (16)	100	1
Thalidomid (8)	100	2

IV. Struktur und resultierende Anreicherung

Zusammenfassend ist festzustellen, daß beim Cellulosetriacetat ebenso wie bei den Polyamiden des Ergebnis des Chromatographieversuches zwar nicht sicher abzuleiten ist, jedoch können aus den erhaltenen Daten Abschätzungen bezüglich des Trennerfolges getroffen werden.

Neben der bereits bekannten Tatsache, daß sich unsubstituierte Phenylreste in Kombination mit Carbonylgruppen am Cellulosetriacetat als besonders wirksame Reste erwiesen haben, fand man, daß kleinere Heterocyclen mit funktionellen Gruppen gut getrennt werden. Dies trifft für den Barbiturat-, Piperidindion- und Succinimidring zu. Bei diesen Racematen wirkt sich ein aromatischer Rest zwar günstig aus, ist aber für eine Aktivierung nicht unbedingt erforderlich. Als weniger geeignete Gruppen erwiesen sich Carboxyl-, Amino- und Hydroxylfunktionen.

Zur Trennung an Polyamiden sind vorwiegend Amid- und Imidstrukturen geeignet. Je mehr Gruppen mit Wasserstoffdonator- oder Acceptoreigenschaften im Molekül vorhanden sind, desto günstiger wird bei entsprechendender sterischer Anordnung die Trennleistung beeinflußt. Amine, Alkohole sowie Ester werden nicht getrennt.

Da die beiden Adsorbentientypen in ihrer Spezifität unterschiedlich sind, decken sie in Kombination schon einen erheblichen Teil der racemischen Substanzklassen ab. Zwar bleibt eine vollständige Racemattrennung immer noch ein Sonderfall, eine meßbare Aktivierung stellt aber schon die Regel dar. Zur chromatographischen Spaltung chiraler Verbindungen können sowohl die Polyamidadsorbentien als auch Cellulosetriacetat gleichermaßen empfohlen werden. Ein banaler, aber nicht zu unterschätzender Unterschied ergibt sich schon durch die verschiedenartigen Standardfließmittel Ethanol und Toluol/Dioxan-Gemische. Dadurch kann man den Löslichkeiten einer größeren Zahl von Substanzen gerecht werden. Bei geeigneter Abstimmung des Racemates auf den Adsorptionsmechanismus der Säule werden das Cellulosetriacetat sowie die Polyamide von keinem anderen zur Racemattrennung geeigneten Adsorbens übertroffen.

F. Technische Weiterentwicklung der chromatographischen Trennmethode

I. Recyclingchromatographie

Vollständige Trennungen erhält man durch mehrmalige Chromatographie der Substanz am gleichen Adsorbens. Es werden exemplarisch zwei Versuche beschrieben, bei denen man jeweils von anderen Voraussetzungen ausging.

1. Vollständige Auftrennung von Mandelamid (20a)

Mandelamid war die Screening-Substanz der Polyamidadsorbentien. An der in dieser Arbeit verwendeten Säule des Adsorbens 1 der Maße 3,2 cm x 76 cm wurde das Racemat zu 82,8 % in einem einfachen Durchlauf schon hoch aktiviert. Der Trennvorgang sollte bis zur quantitativen Trennung der Isomeren fortgesetzt werden. Da die Retentionsvolumen der Mandelamidenantiomeren mit durchschnittlich 2000 ml groß waren, wurde das Eluat zur Kontrolle des Trennerfolges durch die Küvette des Polarimeters und Differentialrefraktometers geleitet und dann im Kreislauf wieder durch die Säule gepumpt. Die Gefahr, daß der stärker retinierte Antipode vom schwächer gebundenen eingeholt wurde, bestand auf Grund des Verhältnisses Retentionsvolumen der Substanz zum Totvolumen der Säule nicht.

Nach vier Durchläufen war Mandelamid vollständig und verlustfrei getrennt. Zur quantitativen Racemattrennung ist also eine 4fache Säulenlänge erforderlich.

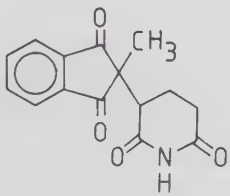
Drehwertmessungen der ausgewogenen Abdampfrückstände des jeweils vereinigten (R)- und (S)-Antipoden ergab scheinbar nur eine 90,3 proz. bzw. 92 proz. optische Reinheit der Enantiomeren. Sie enthielten also noch Verunreinigungen. Die UV-spektroskopische Gehaltsbestimmung lieferte höhere Extinktionen als die Vergleichsprobe, was auf eine aromatenhaltige Verunreinigung hindeutete. Zum Beweis der optischen Reinheit wurde die Chromatographie des (R)-Antipoden und der gleichen Einwaage des Racemates wiederholt.

Das Schreiberdiagramm des (R)-Antipoden wies nur einen einzigen scharfen Drehwert- und Massenpeak auf. Dort, wo im Chromatogramm des Racemates das Maximum der Elutionsbande des (R)-Enantiomeren lag, hielt der Schreiber auch bei empfindlichster Polarimetereinstellung die Basislinie ein.

Ein einfaches Umpumpverfahren ist immer dann günstig, wenn die Aktivierung nach einmaligem Durchlauf bereits hoch und der Vorlauf lang ist und die Peaks der Elutionskurven schmal sind.

2. Isolierung des (-)-Antipoden eines Thalidomidanalogons

Im Rahmen der Arbeiten über die teratogenen Nebenwirkungen von Thalidomidanalogen [54] sollte für Bindungsmessungen optisch aktive Substanz der Verbindung 44 bereitgestellt werden, wobei eine geringe Substanzmenge für die Messung ausreichen würde.



44

Es stand nur eine kleine Menge Racemat zur Verfügung. Die Enantiomeren waren unbekannt. Die Anreicherung kann in einem solchen Fall mit Hilfe der Massenkurve abgeschätzt werden. Wird nur ein scharfes Signal erhalten, liegt die Aktivierung meist unter 50 %. Bessere Trennergebnisse liegen vor, wenn geschulterte Peaks oder Kurven mit tieferen Einschnitten erhalten werden.

Für Trennversuche der Verbindung bot sich das für Thalidomid optimale Adsorbens 2 an. Ein orientierender Chromatographieversuch zeigte jedoch, daß die quantitative Racematspaltung des Thalidomids nicht wiederholt werden

konnte. Die zusätzliche Methylgruppe verhindert offensichtlich eine günstige Einpassung in die Höhlungen der Polymerkette. Der Vorlauf war klein und die Anreicherung mittelmäßig (ein Refraktometersignal). Beim einfachen Recyclingverfahren hätten sich die Elutionsbande bald eingeholt. Daher wurde folgender Weg gewählt:

315 mg Racemat wurden auf die Säule aufgetragen. Nach Elution wurden die an (-)-Enantiomer stärker angereicherten Fraktionen (insgesamt ca. 140 mg) einer siebenmaligen Recyclingchromatographie unterworfen. Nach jedem Durchlauf wurden die jeweiligen Spitzenfraktionen dem Kreislauf entnommen und gesammelt.

Der Trennprozeß wurde so oft wiederholt, bis die Maxima des großen linksdrehenden und des kleinen rechtsdrehenden Peaks genügend weit auseinandergewandert und die Elutionskurve des (-)-Antipoden eine symmetrische Gestalt angenommen hatte.

Die vereinigten Fraktionen wurden aus Ethanol umkristallisiert. Der gefundene Drehwert $[\alpha]_{589} = -127^{o}$ (Dioxan p. a.) (40 mg) stimmte mit dem nach einmaligen Durchlauf gemessenen Drehwinkeln der Anfangs- und Endfraktion dem Betrag nach überein. Dies ist ein Hinweis für die optische Reinheit des Präparates.

II. Trennung von Mandelamid durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Mit diesem Versuch wurde die Eignung der gequollenen Polymerisate zur Hochdruckflüssigkeitschromatographie geprüft. Eine Stahlsäule der Maße 0,8 Ø x 62 cm wurde mit dem in Toluol/Dioxan 1:1 gequollenen Polymeren 1 unter 60 bar Druck gefüllt. Da nur von einer gleichmäßigen, feinkörnigen stationären Phase verbesserte Trenneigenschaften erwartet werden konnten, verwendete man eine windgesichtete Fraktion des Perlpolymerisates. Die Teilchengröße betrug im ungequollenen Zustand 8 - 16 µm. Für das Fließmittel Toluol/Dioxan 1:1 ermittelte man einen Quellfaktor von 3,4. Die Perlen besaßen somit einen Durchmesser von 12 - 24 µ m.

Als Testracemat wurde 1,74 mg Mandelamid aufgetragen und unter 73 bar Druck mit einer Durchflußrate von 0,1 ml/min chromatographiert. Zur Detektion verwendet man ein Differentialrefraktometer. Nach 122 ml Vorlauf eluierte die Substanz in zwei getrennten Peaks. Der Gehalt der Mandelamidenantiomere wurde zur Bestätigung, daß es sich um eine Basislinientrennung handelte, nach Abdampfen der Fraktionen UV-spektroskopisch ermittelt. 1,72 mg Mandelamid konnten nachgewiesen werden. Davon enthielt die Fraktion zwischen den beiden Elutionskurven 0,038 mg Substanz, also 2,25 % der Gesamtmenge. Es ist praktisch eine vollständige Separation der optischen Antipoden erfolgt.

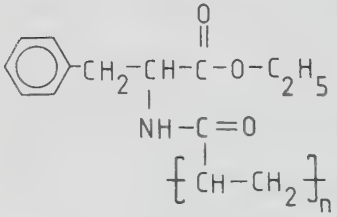
Da die Löslichkeit des Mandelamids im Fließmittel begrenzt ist und nur ein Volumen von 300 µl injiziert werden konnte, war die Belastung der Säule geringer als bei präparativen Chromatographieversuchen.

Dennoch zeigt dieser Versuch, daß ein erfolgversprechender Einsatz der Polyamide zur HPLC möglich ist. Das Gelgerüst wird unter dem angewendeten Druck nicht zerstört, was für elastische Gele keineswegs selbstverständlich ist. Zur Hochdruckflüssigkeitschromatographie können Polymerisate mit geringeren Perlendurchmesser verwendet werden. Solche Materialien zeigen unter Niederdruck bis 6 bar keinen Durchfluß mehr. Somit liefern wie üblich auch bei Polyamiden kleinere gleichmäßige Partikel bessere Trennergebnisse.

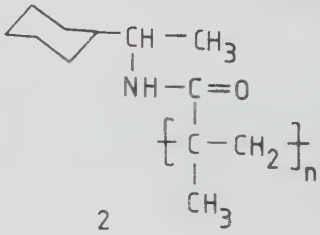
G. Zusammenfassung

Zunächst wurde durch Anwendung der Niederdruckchromatographie die Versuchsdurchführung chromatographischer Racemattrennungen verbessert und beschleunigt.

An den Polyamidadsorbentien 1 und 2



1



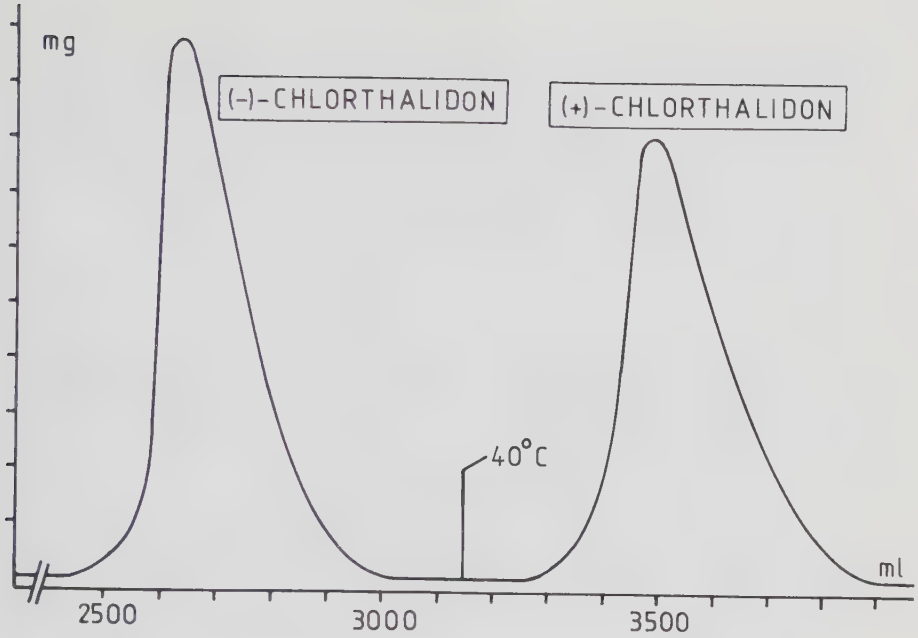
2

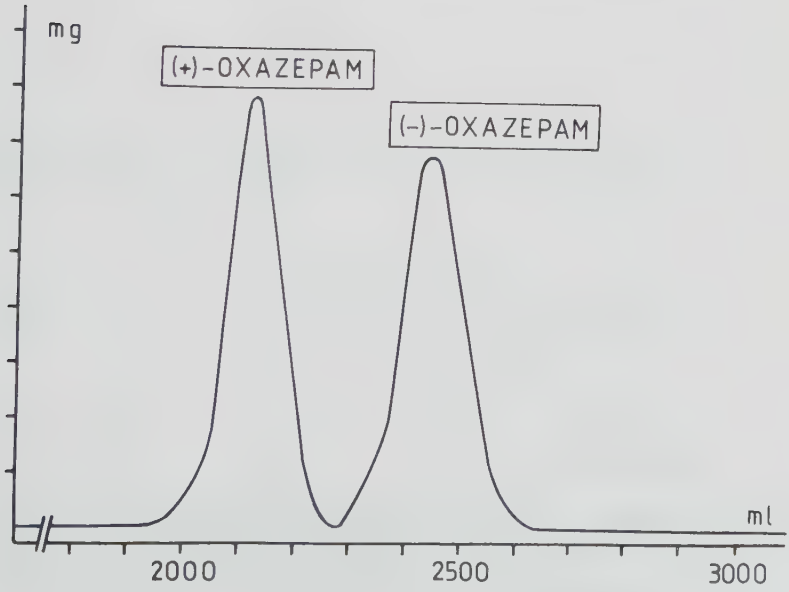
wurden folgende Ergebnisse gefunden:

Ein Pyrazolidindion und Phenprocoumon wurden als neue Substanzklassen durch Chromatographie angetrennt.

Die optisch reinen Antipoden des Biglumids wurden erstmals durch mehrfache Chromatographie isoliert.

Am Phenylalaninadsorbens 1 wurden Chlorthalidon und Oxazepam vollständig getrennt. Auf Grund ihrer Struktur können von diesen beiden Substanzen die Antipoden mit anderen Methoden nicht erhalten werden.

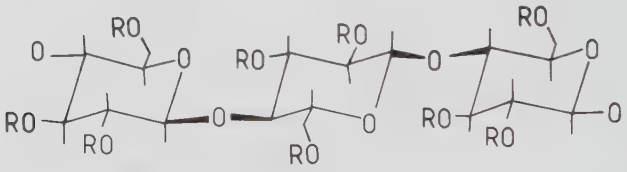

mg
(-)-CHLORTHALIDON
(+)-CHLORTHALIDON
40°C
ml
2500
3000
3500


mg
(+)-OXAZEPAM
(-)-OXAZEPAM
ml
2000
2500
3000

Die Enantiomeren des Biglumids, Chlorthalidons und Oxazepams wurden auf ihre Konfigurationsstabilität untersucht. Während die Antipoden des Oxazepams in wäßriger Lösung spontan racemisieren, konnten von den beiden anderen Arzneistoffenantiomeren die Racemisierungsgeschwindigkeitskonstanten bestimmt werden. Bei den Antipoden des Chlorthalidons sind diese vom pH-Wert abhängig. Ein Mechanismus dafür wurde diskutiert.

Die absolute Konfiguration der Oxazepamisomeren konnte bestimmt werden.

Cellulosetriacetat wurde als weiteres optisch aktives Adsorbens hergestellt und seine Gleichwertigkeit mit dem in der Literatur beschriebenen Produkt bestätigt.



R = Acetyl 3

An Cellulosetriacetat wurden zunächst Testracemate aus folgenden Substanzklassen chromatographiert:

α-substituierte Phenylacetamide
N-Benzoylaminosäureethylester
substituierte Acetamide
Cyanessigsäureamide
Carbonsäuren
Benzoinderivate

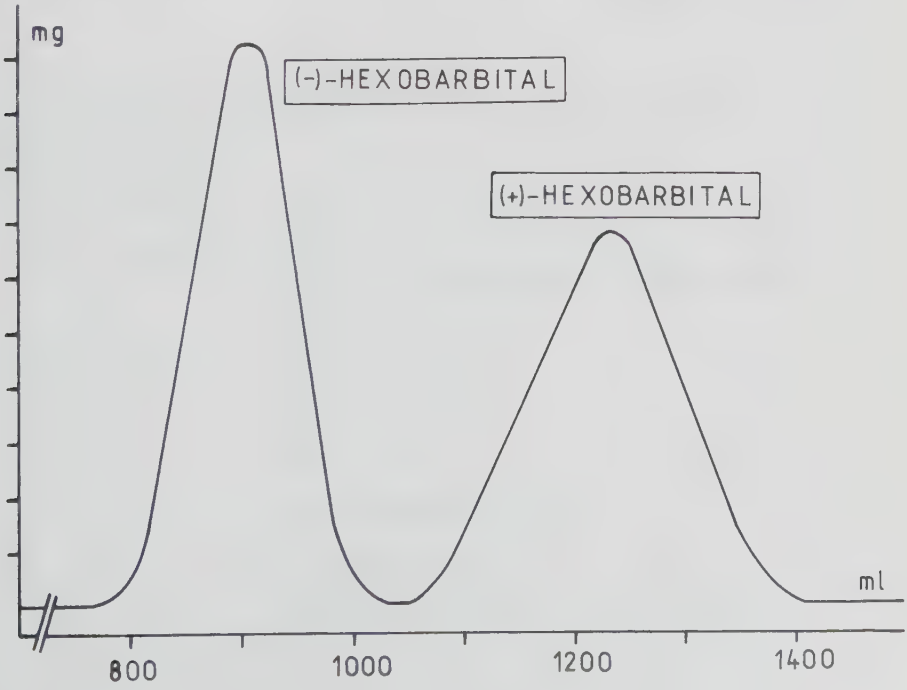
In fast allen Fällen erhielt man eine Anreicherung der Enantiomeren. Mehrere Testracemate wurden mit über 80 %iger optischer Ausbeute, Phenylethylcyanessigsäureamid quantitativ getrennt.

Ferner testete man am Cellulosetriacetat die chromatographische Racemattrennung chiraler Arzneistoffe und Arzneistoffvorstufen. Dabei wurde der Schwerpunkt auf folgende Verbindungsklassen gelegt.

Piperidindione
Hydantoine
Succinimide
Barbiturate
Cyanessigester

In dieser Versuchsreihe konnten gute bis herausragende Trennungen erzielt werden.

Glutethimid und Mesuximid wurden über 80 % aktiviert. Besonders gut getrennt wurden Barbitursäurederivate. Sechs von zehn geprüften chiralen N-Methylbarbituraten wurden vollständig getrennt, darunter Methylphenobarbital und Hexobarbital.



Ferner gelang die quantitative Spaltung von Phenylmethyl- und Phenylethylcyanessigsäuremethylester als Synthesevorstufen von Barbituraten.

Die Ergebnisse der Trennungen an Cellulosetriacetat und an Polyamidadsorbentien wurden verglichen und Gesetzmäßigkeiten der stereoselektiven Adsorption diskutiert.

Beide Adsorbenstypen ergänzen sich auf Grund des unterschiedlichen Sorptionsmechanismus und der verschiedenartigen Elutionsmittel. Durch Auswahl des jeweils besser geeigneten Adsorbens können bereits Stoffe aus sehr unterschiedlichen Substanzklassen durch Chromatographie rationell in die Antipoden getrennt und die optische Reinheit von Enantiomeren geprüft werden.

Ferner wurden moderne Chromatographietechniken auf die chromatographische Racemattrennung übertragen, um die Isolierung der optisch reinen Substanzen zu erleichtern.

Mandelamid wurde durch Recyclingchromatographie vollständig in die Enantiomeren gespalten. Die Recyclingchromatographie wurde ebenfalls für die Isolierung der Biglumidenantiomeren verwendet. Ein Antipode eines Thalidomidanalogons wurde durch kombiniertes Peakshaving und Recycling isoliert.

Abschließend wurde gezeigt, daß die synthetischen Polyamidgele auch zur Hochdruckflüssigkeitschromatographie geeignet sind.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Allgemeine Methoden

Folgende Geräte wurden verwendet für:

Schmelzpunkte	Mettler Fp 5 (korrigiert durch Eichsubstanzen der Fa. Reichert, Wien)
IR-Spektren	Beckman IR 20 A (als KBr-Presslinge)
NMR-Spektren	Varian NMR-Spektrometer T 60 (TMS als innerer Standard) Bruker WH-90 NMR-Spektrometer (TMS als innerer Standard)
UV-Messungen	Zeiss PMQ 3 (Einzelmessungen) Knauer Spektralphotometer Typ 8100 (Durchflußmessungen)
Messung des Brechungsindex	Knauer Differentialrefraktometer Typ 5100
Drehwert-Messungen	Präzisionspolarimeter Perkin-Elmer 241 (Einzel- und Durchflußmessungen mit 1 dm Mikro-(1 ml) und Standardküvette 6, 2 ml
Versuchsdurchführungen	Zwei-Kanal-Schreiber Varian Modell 9176
	Fraktionssammler Ultra Rac 7000
	Membranpumpe Duramat
	Thermostat Haake S F 3 (Temperaturkonstanz: $\pm$ 0, 01°)

Elementaranalysen wurden durch das mikroanalytische Laboratorium Dr. F. und E. Pascher, Bonn, ausgeführt.

Als Abkürzungen werden verwendet:

Acn	= Aceton
$CHCl_3$	= Chloroform
Dxn	= Dioxan
DMF	= Dimethylformamid
ETOH	= Ethanol
Hxn	= n-Hexan
MeOH	= Methanol
Skt	= Skalenteile

Tabellen:

1. V-/- Versuchsnummer / Bezeichnung des Racemates
2. Adsorbens
3. Menge des Adsorbens [g]
4. Abmessungen der Chromatographiesäule, Schichthöhe x Durchmesser [cm x cm]
5. Einwaage des Racemates [mg]
6. Auswaage der eluierten Substanzmenge [mg]
7. $\frac{\text{Auswaage} \cdot 100}{\text{Einwaage}}$ [%]
8. Menge und Art des zum Auftragen verwendeten Lösungsmittels [ml]
9. Elutionsmittel
   A = Toluol : Dioxan 8 : 2
   B = Toluol : Dioxan 1 : 1
   C = 95 % ETOH
10. Druck [bar]
11. Fließgeschwindigkeit [ml/h]
12. Vorlauf [ml]
13. Anzahl der substanzführenden Fraktionen x Volumen jeder Fraktion
14. Gehaltsbestimmung
    g = gravimetrisch
    UV (λ) = UV spektroskopisch bei λmax
    RI = Bestimmung des Brechungsindex
15. Wellenlänge, bei der die Drehwerte gemessen werden [nm]
16. Menge [ml] und Art des zur Drehwertmessung verwendeten Lösungsmittels
17. Konfiguration (R, S) bzw. Drehrichtung (d, l) = (+/-) des bevorzugt adsorbierten Enantiomeren
18. Ag = optische Ausbeute über alle Fraktionen
19. Trennfaktor α
20. Auflösung R_S

Bestimmung des Eichfaktors für die Masse S

s, der Umrechnungsfaktor zwischen Extinktion bzw. Refraktion und der zugehörigen Konzentration wird wie folgt bestimmt:

Aus drei Meßproben der Substanz unterschiedlicher Konzentration wird berechnet, wie viele Skalenteile auf dem Schreiberpapier der Konzentration von 1 mg/ml entsprechen.

Außerdem wird bestimmt, welches Eluatvolumen dem Papiervorschub von 1 cm entspricht.

s ist das Produkt aus Konzentration und dem Volumen (Gleichung 1).

II. Trennungen an Polyamiden

1. N-Benzoyl-tyrosinethylester 7

Schmp. Lit.[56] : 123 - 124 °C
Schmp. gef.[55] : 124 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365} = -136,9^{\circ}$ (c = 0,2, MeOH)[55]

Die Drehrichtung ist vom Lösungsmittel abhängig.

$$[\alpha]_{365} = +406^{\circ} \text{ (Toluol)}$$

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 1/7	2	65	62 x 2,5	199,7	201,8	101	10 A	A	—

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 1/7	30	1100	16 x 20	g	365	5 MeOH	S	89,8

Frakt.-Nr.	ES	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_S	m_R	Ai
1	12,6	+ 0,333	132,2	0,2	12,4	96,6
2	24,6	+ 0,656	133,3	0,3	24,3	97,4
3	21,5	+ 0,575	133,7	0,2	21,3	97,7
4	17,0	+ 0,438	128,8	0,5	16,5	94,1
5	13,0	+ 0,309	118,9	0,9	12,1	86,9
6	8,5	+ 0,192	113	0,7	7,8	82,5
7	7,0	+ 0,026	18,6	3,0	4,0	13,6
8	11,5	- 0,216	93,9	9,7	1,8	68,6
9	16,2	- 0,400	123,5	15,4	0,8	90,2
10	16,6	- 0,430	129,5	16,2	0,4	94,6
11	14,2	- 0,380	133,8	14,0	0,2	97,7
12	12,3	- 0,319	129,7	12,0	0,3	94,7
13	9,8	- 0,256	130,6	9,6	0,2	95,4
14	7,6	- 0,197	129,6	7,4	0,2	94,7
15	5,4	- 0,140	129,6	5,3	0,1	94,7
16	4,0	- 0,095	118,8	3,7	0,3	86,8
	201,8			99,1	102,7	Ag:89,8

2. Thalidomid (Contergan^{R}) 8

Schmp. Lit.[57] : 269 - 273 °C

Schmp. gef. : 275 °C

(S)-Enantiomer $[\alpha]_{589}^{25}$ = - 64,6° (c = 2,0 DMF)[57]

(R)-Enantiomer $[\alpha]_{589}^{25}$ = + 64,0° (c = 2,0 DMF)[57]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 2/8	2	65	62x2,4	56,6	66	116,6	10A	A	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 2/8	40	620[1)]	20x20	g	589	2DMF	S	100

1. ab 800 ml Wassermantel der Säule auf 50 °C erwärmt

Die Fraktionen des (R)- und (S)-Antipoden wurden jeweils vereinigt und ausgewogen. Da die optisch aktiven Thalidomidkristalle hartnäckig Dioxan einschlossen, wurden die Enantiomere durch Umfällen in DMF/Wasser (v/v) gereinigt. Man löste die optischen Isomeren in 2 ml DMF und kühlte auf 0 °C ab. Nach tropfenweiser Zugabe von 8 ml Wasser wurde nach einer Stunde das Präcipitat abgesaugt und mit kaltem Wasser gewaschen. Anschließend wurde im Hochvakuum über Phosphorpentoxid getrocknet.

umgefälltes Produkt	(R)-Enantiomer	(S)-Enantiomer
	23 mg (81,3 %)	21 mg (74,2 %)
Schmp.	270 °C	271 °C
Drehwerte (DMF)	$[\alpha]_{589}^{21}$ = + 63,1°	$[\alpha]_{589}^{21}$ = - 63,6°

3. 4-Methyl-1,4-diphenyl-3,5-pyrazolidindion 10

Schmp. gef. : 173 °C

(-)-Enantiomer $[\alpha]_{589}$ = - 79° (ETOH)[15)]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 3/10	1	250	76 x 3,2	101,3	101,6	100	10 B	B	2

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 3/10	40	760	12 x 20	g	589	2 ETOH	1	61,7

Frakt.-Nr.	ES	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	m_d	m_l	Ai
1	1,6	+0,060	+ 75	1,5	0,1	94,9
2	5,7	+ 0,210	+ 73,6	5,5	0,2	93,2
3	11,1	+ 0,398	+ 71,8	10,6	0,5	90,9
4	18,0	+ 0,600	+ 66,7	16,6	1,4	84,4
5	17,6	+ 0,211	+ 24	11,5	6,1	30,4
6	11,3	+ 0,033	+ 5,8	6	5,3	7,3
7	10,0	+ 0,120	- 24	3,5	6,5	30,4
8	7,9	- 0,215	- 54,4	1,3	6,6	68,9
9	6,5	- 0,215	- 66,2	0,5	6	83,8
10	6,0	- 0,203	- 67,7	0,4	5,6	85,7
11	4,3	- 0,150	- 70	0,3	4	88,6
12	1,6	- 0,060	- 75	0,1	1,5	94,9
	101,6					Ag: 61,7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 4/10	2	65	126 x 2,4	110,4	110,1	100	6 B	B	3

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 4/10	18	240	14 x 20	g	589	2 ETOH	1	13

Frakt.-Nr.	ES	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	m_d	m_l	Ai
1	2,9	+ 0,060	+ 41,4	2,2	0,7	52,4
2	5,7	+ 0,055	+ 19,3	3,5	2,2	24,4
3	9,7	+ 0,043	+ 8,9	5,4	4,3	11,3
4	10,7	+ 0,040	+ 7,5	5,9	4,8	9,5
5	9,7	+ 0,033	+ 6,8	5,3	4,4	8,6
6	9,2	+ 0,030	+ 6,5	5,0	4,2	8,2
7	9,2	+ 0,030	+ 6,5	5,0	4,2	8,2
8	10,1	+ 0,008	+ 1,6	5,1	5,0	2,0
9	9,7	- 0,013	- 2,7	4,7	5,0	3,4
10	8,4	- 0,025	- 6,0	3,9	4,5	7,6
11	7,8	- 0,045	- 11,5	3,3	4,5	14,6
12	7,3	- 0,043	- 11,8	3,1	4,2	14,9
13	6,4	- 0,068	- 21,3	2,4	4,0	27
14	3,3	- 0,070	- 42,4	0,8	2,5	53,7
	110,1					Ag : 13

4. Phenprocoumon 11

Schmp. Lit.[16] : 170 - 171 °C

Schmp. gef. : 170 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{589}$ = - 122,6 ° (ETOH)[16]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 5/11	1	250	76 x 3,2	295,5	292,9	99	10 B	B	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 5/11	50	600	10 x 20	g	589	2 ETOH 4 ETOH	R	19,7

Frankt.-Nr.	ES	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	m	m	Ai
1	5,1	- 0,190	- 74,5			60,7
2	12,0	- 0,300	- 50,0			40,8
3	25,3	- 0,339	- 26,8			21,9
4	58,3	- 0,380 +)	- 26,0			21,2
5	66,1	- 0,200 +)	- 12,1			9,9
6	56,9	+ 0,134 +)	+ 9,4			7,7
7	39,1	+ 0,245 +)	+ 25,1			20,5
8	20,5	+ 0,429	+ 41,9			34,2
9	8,3	+ 0,250	+ 60,2			49,1
10	2,7	+ 0,104	+ 77,0			62,8
	292,9					Ag: 19,7

+) 4 ml ETOH

5. Biglumid 12

Schmp. Lit.[17] : 234 - 236 °C
Schmp. gef. : 234 °C

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 6/12	1	250	76 x 3,2	301,8	298,3	98,8	10B	B	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 6/12	50	780	6 x 20	g	365	5DMF	d	11,1

Frakt.-Nr.	ES	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_d	m_l	Ai
1	4,1	- 0,036	- 43,9	1,3	2,8	37,7
2	25,0	- 0,159	- 31,8	9,1	15,9	27,3
3	71,5	- 0,202	- 14,2	31,5	40,0	12,1
4	98,4	+ 0,030	+ 1,5	49,8	48,6	1,3
5	77,2	+ 0,183	+ 11,9	34,7	42,5	10,2
6	22,1	+ 0,165	+ 37,3	7,5	14,6	32
	298,3					Ag: 11,1

a) Isolierung der Biglumidenatiomeren

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
7/12	2	65	62 x 2,4	302,8	300	99	10B	B	2
8/12				313,1	302	96,5			

1	11	12	13	14	15	16	17
7/12	40	200	7 x 20	g	365	2DMF	l
8/12							

Die Fraktionen der Versuche V 7/12 und V 8/12, deren Drehwert über $[\alpha]_{365} = -85^{\circ}$ und $[\alpha]_{365} = +85^{\circ}$ lag, wurden jeweils vereinigt.

Der ermittelte Spitzendrehwert der Anfangs- und Endfraktionen lag bei $[\alpha]_{365} = -116^{\circ}$ und $[\alpha]_{365} = +117^{\circ}$

(-)-Antipode : 200 mg
(+)-Antipode : 140 mg

Durch dreimaliges Recycling wurde der jeweils andere Antipode aus den beiden aktivierten Proben abgetrennt. V 9/12, 10/12

Die beiden isolierten Enantiomeren wurden zum Beweis der optischen Reinheit erneut chromatographiert. In beiden Fällen erhielt man nur eine Elutionsbande. V 11/12, V 12/12

Die Biglumidisomeren wurden 2 x aus ETOH umkristallisiert..

(+)-Antipode:
9,046 mg in 2 ml DMF $\alpha^{25}_{365} = +0,574^{\circ}$ $[\alpha]^{25}_{365} = +115,4^{\circ}$
$\alpha^{25}_{589} = +0,149^{\circ}$ $[\alpha]^{25}_{589} = +30^{\circ}$

(-)-Antipode:
9,723 mg in 2 ml DMF $\alpha^{25}_{365} = -0,567^{\circ}$ $[\alpha]^{25}_{365} = -116,6^{\circ}$
$\alpha^{25}_{589} = -0,144^{\circ}$ $[\alpha]^{25}_{589} = -29,6^{\circ}$

isolierte Substanz:
(+)-Antipode: 86,3 mg Schmp. : 242°C (Zers.)
(-)-Antipode: 179,5 mg Schmp. : 242°C (Zers.)

$C_{14} H_{16} N_2 O_4$ (276, 29)

(-)-Enantiomer : Ber. C 60,86 H 5,84 N 10,14
Gef. C 60,83 H 5,89 N 10,16

b) Racemisierungskinetik des (-)-Enantiomeren von Biglumid

5 mg (-)-Biglumid + 1 ml Dioxan + 1 ml Puffer pH 7,4

Zeit min	α_{436}	log-3
7	- 0,160	2,2
8	- 0,155	2,19
9	- 0,149	2,17
10	- 0,145	2,16
11	- 0,140	2,15
12	- 0,136	2,13
13	- 0,131	2,12
14	- 0,126	2,10
15	- 0,121	2,08
16	- 0,116	2,06
17	- 0,110	2,04
18	- 0,105	2,02
19	- 0,100	2,00
20	- 0,096	1,98
25	- 0,075	1,88
30	- 0,050	1,70

$k_1 = 0,046 \ min^{-1}$

Halbwertszeit $\frac{0,693}{0,046} = 15,06$ min

c) Synthese von Exobiglumid 13

3-(1,4-Endomethylen-cyclohexan-2,3-exo-cis-dicarboximido)-piperidin-2,6-dion

60,0 g des Diels-Alder-Adduktes aus Maleinsäureanhydrid und Cyclopentadien werden nach Literatur 18 durch thermische Umlagerung (190°C) in die Exo-Form überführt und mehrfach aus Toluol umkristallisiert,bis das reine Isomere erhalten wird.

Schmp. Lit. [18]: 142 - 143 °C
Schmp. gef. : 143 °C

Das Exo-Anhydrid wird in Essigester bei 70 °C/30 bar an 5 %iger Palladiumkohle hydriert.

Schmp. Lit. [17] : 80 - 82 °C
Schmp. gef. : 82 °C

6,0 g dieses Produktes werden mit 5,1 g L (+) Glutaminsäure zwei Stunden in 50 ml absolutem Pyridin gekocht. Nach dem Erkalten wird filtriert und im Vakuum eingedampft. Der ölige Rückstand wird fünf Minuten mit 15 ml Acetanhydrid zum Sieden erhitzt, erneut im Vakuum von flüchtigen Anteilen befreit und ohne weitere Reinigung mit 4,0 g Harnstoff dreißig Minuten im Kugelrohrofen auf 180 °C erhitzt. Die glasige Masse wird mit Wasser angerieben, wobei sie kristallin wird. Das Rohprodukt wird in DMF gelöst und mit Wasser ausgefällt.

Schmp. Lit. [17] : 259 - 261 °C
Schmp. gef. : 262 °C

Die exo-Konfiguration wurde anhand des NMR-Spektrums (90 MHz) durch Vergleich mit der endo-Form bestätigt.

d) Vergleichende Chromatographie von Endo- und Exobiglumid bei gleicher Einwaage (Endobiglumid V 13/12, Exobiglumid V 14/13)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 13/12 V 14/13	2	65	126 x 2,4	160,0 160,1	158,2 157,7	98,9 98,5	10B	B	3

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 13/12 V 14/13	18	280	8 x 20	g	365/589	2DMF	1 1	54,6

V 13/12

Frakt.-Nr.	ES	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	Ai
1	2,0	+ 0,116	+ 116,0	+ 0,030	+ 30,0	100
2	17	+ 0,994	+ 116,9	+ 0,267	+ 31,4	100
3	40,5	+ 1,284	+ 63,4	+ 0,333	+ 16,4	54,4
4	42,2	- 0,230	- 10,9	- 0,060	- 2,8	9,3
5	27,4	- 0,922	- 67,3	- 0,239	- 17,4	57,7
6	16,6	- 0,764	- 92,1	- 0,198	- 23,9	79
7	10,3	- 0,608	- 118,1	- 0,158	- 30,7	100
8	2,2	- 0,130	- 118,2	- 0,033	- 30,0	100
	158,2					Ag: 54,6

V 14/13

Frakt.-Nr.	E S	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	α_{589}	$[\alpha]_{589}$
1	2,4	+ 0,147	+ 122,5	+ 0,038	+ 31,7
2	18	+ 1,053	+ 117	+ 0,272	+ 30,2
3	35,7	+ 1,142	+ 64	+ 0,295	+ 16,5
4	40,6	- 0,365	- 18	- 0,095	- 4,7
5	25,4	- 0,861	- 67,8	- 0,223	- 17,6
6	23,1	- 0,990	- 85,7	- 0,256	- 22,1
7	10,5	- 0,614	- 117	- 0,159	- 30,3
8	2,0	- 0,116	- 116	- 0,030	- 30,0
	157,7				

6. Chlorthalidon 14

a) Isolierung der Chlorthalidonenantiomeren

Schmp. Lit. [19] : 220 °C
Schmp. gef. : 219 °C

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 15/14	1	250	76 x 3,2	311,3	300	96,4	8 B	B	1,2

1	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V 15/14	50	2500	45 x 20	g	365	2 Dxn	d	100	1,45	2,7

Totvolumen der Säule : 700 ml
Retentionsvolumen des (-)-Enantiomeren : 2900 ml
Retentionsvolumen des (+)-Enantiomeren : 3900 ml
Basisbreite des (-)-Enantiomeren : 300 ml
Basisbreite des (+)-Enantiomeren : 440 ml

Die Fraktionen des (-)-Enantiomeren und des (+)-Enantiomeren wurden jeweils vereinigt und aus $CHCl_3$ umkristallisiert.

Drehwertmessungen ergaben:
(-)-Chlorthalidon : 10,2 mg in 2 ml Dxn p. a. $\alpha^{25}_{365} = -2,880^{\circ}$, $[\alpha]^{25}_{365} = -564,7^{\circ}$
(+)-Chlorthalidon : 10,3 mg in 2 ml Dxn p. a. $\alpha^{25}_{365} = +2,730^{\circ}$, $[\alpha]^{25}_{365} = +530,1^{\circ}$

Durch das im Chloroform enthaltene HCl erhielt man durch teilweise Racemisierung keine optisch reinen Antipoden.

Der Versuch wurde zweimal wiederholt V 16/14, V 17/14.
Die Daten entsprechen V 15/14

1	5	6	7
V 16/14	307,3	300	97,6
V 17/14	530	525	99

Nach Elution des (-)-Enantiomeren wurde die Säulentemperatur auf 40 °C erhöht.

Die Fraktionen des (-)- und (+)-Antipoden aus beiden Versuchen wurden jeweils vereinigt.

Die Enantiomeren wurden in heißem absoluten Aceton gerade gelöst und soviel Pentan zugetropft, bis eine leichte Trübung eintrat.

(-)-Enantiomer: 250 mg Schmp. 264 °C (Zers.)
(+)-Enantiomer: 220 mg Schmp. 264 °C (Zers.)

(-)-Chlorthalidon: 5, 054 mg in 2 ml Dxn p. a. $\alpha^{25}_{365} = -1,500^{\circ}$ $[\alpha]^{25}_{365} = -593,6^{\circ}$

$\alpha^{25}_{365} = -0,354^{\circ}$ $[\alpha]^{25}_{589} = -140,1^{\circ}$

(+)-Chlorthalidon: 5, 010 mg in 2 ml Dxn p. a. $\alpha^{25}_{365} = +1,491^{\circ}$ $[\alpha]^{25}_{365} = +595,2^{\circ}$

$\alpha^{25}_{589} = +0,353^{\circ}$ $[\alpha]^{25}_{589} = +140,9^{\circ}$

$C_{14}\,H_{11}\,Cl\,N_2\,O_4\,S$ (338, 8)

(-)-Antipode:	Ber.	C 49, 63	H 3, 27	N 8, 27
	Gef.	C 49, 80	H 3, 32	N 8, 10
(+)-Antipode:	Ber.	C 49, 63	H 3, 27	N 8, 27
	Gef.	C 49, 60	H 3, 50	N 7, 95

b) Racemisierungskinetik bei verschiedenen pH-Werten

Racemisierungskinetik von (-)-Chlorthalidon pH 7,4

5,3 mg Substanz in 1 ml Dxn gelöst + 1 ml Phosphatpuffer pH 7,4

Zeit [min]	/ [s]	α_{365}	log - 3	Zeit [min]	/ [s]	α_{365}	log - 3
1	-	- 1,145	3,06	7	-	- 0,270	2,43
	15	- 1,082	3,03		30	- 0,237	2,37
	30	- 1,021	3,01	8	-	- 0,210	2,32
	45	- 0,959	2,98		30	- 0,183	2,26
2	-	- 0,903	2,96	9	-	- 0,163	2,21
	15	- 0,850	2,93		30	- 0,146	2,16
	30	- 0,800	2,90	10	-	- 0,129	2,11
	45	- 0,772	2,88		30	- 0,115	2,06
3	-	- 0,711	2,85	11	-	- 0,103	2,01
	15	- 0,669	2,83		30	- 0,090	1,95
	30	- 0,629	2,80	12	-	- 0,078	1,89
	45	- 0,595	2,77		30	- 0,069	1,84
4	-	- 0,558	2,74	13	-	- 0,062	1,79
	15	- 0,524	2,71		30	- 0,055	1,74
	30	- 0,494	2,69	14	-	- 0,050	1,70
	45	- 0,468	2,67		30	- 0,042	1,62
5	-	- 0,436	2,64	15	-	- 0,039	1,59
	15	- 0,411	2,61		30	- 0,037	1,57
	30	- 0,396	2,59	16	-	- 0,031	1,49
	45	- 0,365	2,56	17	-	- 0,025	1,39
6	-	- 0,343	2,54	18	-	- 0,020	1,30
	15	- 0,321	2,50	19	-	- 0,018	1,25
	30	- 0,304	2,48	20	-	- 0,015	1,17
	45	- 0,283	2,45				

$k_1 = 0,2395 \text{ min}^{-1}$

Halbwertszeit $\frac{0,693}{0,2395} = 2,89 \text{ min}$

Racemisierungskinetik von (+)-Chlorthalidon pH 7,4

5,28 mg Substanz in 1 ml Dxn gelöst + 1 ml Phosphatpuffer pH 7,4

Zeit [min] /[s]	α_{365}	log - 3	Zeit [min] /[s]	α_{365}	log - 3
1 -	+ 0,915	2,96	7 -	+ 0,216	2,33
30	+ 0,915	2,96	30	+ 0,190	2,28
2 -	+ 0,821	2,91	8 -	+ 0,163	2,21
30	+ 0,727	2,86	30	+ 0,146	2,16
3 -	+ 0,645	2,80	9 -	+ 0,126	2,10
30	+ 0,550	2,74	30	+ 0,106	2,03
4 -	+ 0,480	2,68	10 -	+ 0,095	1,98
30	+ 0,426	2,63	30	+ 0,084	1,93
5 -	+ 0,364	2,56	11 -	+ 0,074	1,87
30	+ 0,322	2,50	12 -	+ 0,065	1,81
6 -	+ 0,282	2,45	13 -	+ 0,055	1,74
30	+ 0,243	2,39	14 -	+ 0,040	1,60

$k_1 = 0,2533 \ min^{-1}$

Halbwertszeit $\frac{0,693}{0,2533} = 2,74$ min

Racemisierungskinetik von (-)-Chlorthalidon pH 6

5,1 mg Substanz in 1 ml Dxn gelöst + 1 ml Phosphatpuffer pH 6

Zeit [min]	α_{365}	log - 3	Zeit [min]	α_{365}	log - 3
1	- 1,346	3,13	14	- 1,220	3,09
2	- 1,323	3,12	15	- 1,210	3,08
3	- 1,314	3,12	16	- 1,200	3,08
4	- 1,305	3,12	17	- 1,189	3,08
5	- 1,302	3,11	18	- 1,179	3,07
6	- 1,294	3,11	19	- 1,165	3,07
7	- 1,290	3,11	20	- 1,151	3,06
8	- 1,288	3,11	30	- 1,033	3,01
9	- 1,263	3,11	43	- 0,876	2,94
10	- 1,263	3,10	64	- 0,640	2,81
11	- 1,261	3,10	92	- 0,394	2,60
12	- 1,241	3,09	120	- 0,227	2,36
13	- 1,232	3,09	155	- 0,103	2,01

$k_1 = 0,017 \ min^{-1}$

Halbwertszeit $\frac{0,693}{0,017} = 40,8 \ min$

Racemisierungskinetik von (-)-Chlorthalidon pH 4

5,3 mg Substanz in 1 ml Dxn gelöst + 1 ml Citratpuffer pH 4

Der Drehwert blieb im beobachteten Zeitraum von 7 Stunden stabil.

Racemisierungskinetik von (-)-Chlorthalidon pH 3

4,9 mg Substanz in 1 ml Dxn gelöst + 1 ml Citratpuffer pH 3

Der Drehwert blieb im beobachteten Zeitraum von 7 Stunden stabil.

Racemisierungskinetik von (-)-Chlorthalidon pH 2,2

5,7 mg Substanz in 1 ml Dxn gelöst + 1 ml Citratpuffer pH 2,2

Der Drehwert blieb im beobachteten Zeitraum von 7 Stunden stabil.

Racemisierungskinetik von (-)-Chlorthalidon pH 1,2

5,1 mg Substanz in 1 ml Dxn gelöst + 1 ml Citratpuffer pH 1,2

Zeit [h]	α_{365}	log - 3
1	- 1,335	3,13
2	- 1,105	3,04
3	- 0,978	2,99
4	- 0,900	2,95
5	- 0,877	2,94
6	- 0,853	2,93
7	- 0,840	2,92

$k_1 = 0,0016 \quad min^{-1}$

Halbwertszeit $\frac{0,693}{0,0016} = 7,2$ Stunden

Racemisierungskinetik von (-)-Chlorthalidon pH 0

5,1 mg Substanz gelöst in 1 ml Dioxan + 1 ml 1 N-HCl = pH 0

Zeit [min]	α_{365}	log - 3	Zeit [min]	α_{365}	log - 3
2	- 1,254	3,10	16	- 0,732	2,86
3	- 1,218	3,09	17	- 0,699	2,84
4	- 1,190	3,08	18	- 0,661	2,82
5	- 1,163	3,07	19	- 0,632	2,80
7	- 1,103	3,04	20	- 0,599	2,78
8	- 1,057	3,02	25	- 0,452	2,66
9	- 1,013	3,01	30	- 0,333	2,52
10	- 0,969	2,99	40	- 0,169	2,23
11	- 0,933	2,97	50	- 0,090	1,95
12	- 0,884	2,95	60	- 0,041	1,61
13	- 0,849	2,93	70	- 0,022	1,34
14	- 0,812	2,91	80	- 0,016	1,20
15	- 0,774	2,89			

$k_1 = 0,060 \text{ min}^{-1}$

Halbwertszeit $\frac{0,693}{0,060} = 11,55$ min

c) Synthese von Chlorthalidonmethylether 15

2 g Chlorthalidon wurden in 110 ml Methanol, welche 0,5 g HCl enthielten, gelöst und zum Sieden erhitzt. Dann destillierte man das Methanol ab, zuletzt im Vakuum, und kristallisierte den Rückstand aus Methanol um.

Schmp. Lit. [19] : 121 - 123 °C (Zers.)
Schmp. gef. : 121 °C (Zers.)

Dieses Produkt enthielt Kristallwasser.

d) Chlorthalidonmethylether 15

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 18/15	1	250	76 x 3,2	299	299,8	100	10 B	B	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 18/15	50	1600	19 x 20	g	365	5 Dxn	d	85,7

Frakt.-Nr.	ES	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_d	m_l	Ai
1	4,6	- 0,500	- 543,5	0,2	4,4	89,7
2	8,2	- 0,980	- 597,3	0,1	8,1	98,5
3	16,6	- 2,021	- 608,7	0	16,6	100
4	25,9	- 3,170	- 612	0	25,9	100
5	27,2	- 3,205	- 589,1	0,4	26,8	97,2
6	26,1	- 3,015	- 577,6	0,6	25,5	95,3
7	18,6	- 1,922	- 516,7	1,4	17,2	85,2
8	15,1	- 1,214	- 402	2,5	12,6	66,3
9	14,1	- 0,393	- 139,3	5,5	8,6	23
10	13,8	+ 0,458	+ 165,9	8,8	5	26,9
11	12,9	+ 1,048	+ 406,2	10,8	2,1	65,8
12	19,6	+ 1,967	+ 501,8	17,9	1,7	81,3
13	21,2	+ 2,357	+ 555,9	20,3	0,9	90,1
14	21,3	+ 2,478	+ 581,7	20,9	0,4	94,2
15	17,7	+ 2,145	+ 605,9	17,7	0	98,2
16	13,3	+ 1,700	+ 639,1	13,3	0	100
17	11,2	+ 1,438	+ 641,9	11,2	0	100
18	7,3	+ 0,990	+ 678	7,3	0	100
19	5,1	+ 0,667	+ 653,9	5,1	0	100
	299,8					Ag: 85,7

V 19/15

Prüfung der optischen Reinheit des (-)-Enantiomeren

Die Fraktionen 1 - 5 des Versuches V 18/15 wurden zusammengefaßt und erneut chromatographiert. Die gefundene Drehwert wurde als spezifischer Drehwert bei der Berechnung der optischen Ausbeute des Versuches V 18/15 zugrundegelegt.

10, 1 mg Substanz in 5 ml Dxn $\alpha_{365} = -1,224^{o}$, $[\alpha]_{365} = -606^{o}$

$\alpha_{589} = -0,285^{o}$, $[\alpha]_{589} = -141^{o}$

7. Oxazepam 16

a) Isolierung der Enantiomeren

Schmp. Lit.[58] : 205 - 206 °C

Schmp. gef. : 205 °C

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 20/16	1	250	76 x 3,2	254,8	250	98,1	30 B	B	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 20/16	50	1800	41 x 20	g	365	5 Dxn	R	-

Die optisch aktive Substanz racemisierte bei der statischen Drehwertmessung. Vorversuche ergaben, daß die Oxazepamantipoden weder alkali- (Glasbehälter) noch säurestabil waren. In Gegenwart von Wasser trat auch Racemisierung ein.

Der Versuch wurde im absoluten Fließmittel wiederholt.

1	5	6	7	8	18	19	20
V 21/16	45,6	45,6	100	10 B	100	1,27	1,17

Der spezifische Drehwert $[\alpha]_{365}$ wurde aus dem Schreiberdiagramm errechnet.

(+)-Elutionskurve : 22,8 mg, Volumen : 315 ml

Maximaler Drehwert $\alpha_{365}^{22} = +0,220$

Halbmaximaler Drehwert $\alpha_{365}^{22} = +0,110$

$$[\alpha]_{365}^{22} = \frac{0,11 \cdot 315 \cdot 1000}{22,8} = +1519^{\circ} \text{ (Toluol : Dioxan 1 : 1)}$$

(-)-Elutionskurve : 22,8 mg, Volumen : 345 ml

Maximaler Drehwert $\alpha \begin{matrix} 22 \\ 365 \end{matrix} = -0,200$

Halbmaximaler Drehwert $\alpha \begin{matrix} 22 \\ 365 \end{matrix} = -0,100$

$$[\alpha] \begin{matrix} 22 \\ 365 \end{matrix} = \frac{0,1 \cdot 345 \cdot 1000}{22,8} = -1513^{o} \quad \text{(Toluol : Dioxan 1 : 1)}$$

$$f = \frac{589}{365} = 0,285 \quad \text{(Proben V 22/16)}$$

(S)-Enantiomer Oxazepam : $[\alpha] \begin{matrix} 22 \\ 365 \end{matrix} = +1519^{o}$

$[\alpha] \begin{matrix} 22 \\ 589 \end{matrix} = +432,9^{o}$

(R)-Enantiomer Oxazepam : $[\alpha] \begin{matrix} 22 \\ 365 \end{matrix} = -1513^{o}$

$[\alpha] \begin{matrix} 22 \\ 589 \end{matrix} = -431,2^{o}$

Zur Gewinnung teilaktivierter Substanz wurde der Versuch mit absolutem Fließmittel wiederholt. Die Fraktionen wurden in Polypropylenflaschen aufgefangen.

1	5	8	13	14	15	16
V 22/16	297,9	30 B	14 x 55	UV 315	365	5 Dxn

Drehwerte einiger Fraktionen

(S)-Enantiomer:

1. Frakt. 20,0 mg in 5 ml Dxn $\alpha_{365} = +4{,}000 \mathrel{\hat{=}} [\alpha]_{365} = +1000^{o}$

2. Frakt. 37,0 mg in 5 ml Dxn $\alpha_{365} = +7{,}548 \mathrel{\hat{=}} [\alpha]_{365} = +1020^{o}$

3. Frakt. 28,7 mg in 5 ml Dxn $\alpha_{365} = +5{,}510 \mathrel{\hat{=}} [\alpha]_{365} = +959{,}9^{o}$

(R)-Enantiomer:

4. Frakt. 23,4 mg in 5 ml Dxn $\alpha_{365} = -4{,}540 \mathrel{\hat{=}} [\alpha]_{365} = -970{,}1^{o}$

5. Frakt. 34,6 mg in 5 ml Dxn $\alpha_{365} = -7{,}003 \mathrel{\hat{=}} [\alpha]_{365} = -1012^{o}$

6. Frakt. 30,5 mg in 5 ml Dxn $\alpha_{365} = -5{,}533 \mathrel{\hat{=}} [\alpha]_{365} = -907^{o}$

Nach der Drehwertmessung wurde die Gewichtsmenge jeder Fraktion UV-spektroskopisch bestimmt.

b) Bestimmung der absoluten Konfiguration von Oxazepam

Die Drehwerte der Fraktionen 1 und 4 des Versuches V 28/16 wurden in DMF p. a. gemessen.

1. Frakt. 20,0 mg in 5 ml DMF $\alpha_{436} = +3{,}560$

4. Frakt. 23,4 mg in 5 ml DMF $\alpha_{436} = -4{,}048$

Fraktion 2 und 5 wurden in je 5 ml absolutem Ethanol gelöst. Es wurde schnell Natriumalkoholatlösung zugetropft, etwas mehr als 2 Äquivalente. Da nur ein geringer Niederschlag des Oxazepamsalzes entstanden war, wurden die Proben schnell zur Trockene eingedampft und in jeweils 5 ml DMF gelöst.

2. Frakt. 37 mg in 5 ml DMF $\alpha_{436} = +0{,}908^{o}$

5. Frakt. 34,6 mg in 5 ml DMF $\alpha_{436} = -0{,}815^{o}$

8. Camazepam 18

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 23/18	1	250	76 x 3,2	253,4	—	—	10B	B	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 23/18	50	—	—	—	365	—	—	—

Die Substanz ließ sich mit 4,3 l Fließmittel nicht eluieren.

9. Phenylethylcyanessigsäureamid 23 a

Schmp. gef. : 119 °C

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 64/23 a	1	250	76 x 3,2	108	105,1	97,3	10B	B	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 64/23 a	50	900	7 x 20	g	365	2 ETOH	1	50

Frakt.-Nr.	ES	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_d	m_l	Ai
1	3,7	+ 0,085	+ 45,9	3	0,7	66,5
2	12,5	+ 0,282	+ 45,1	10,3	2,2	65,3
3	26	+ 0,480	+ 36,9	19,9	6,1	53,5
4	28,7	- 0,040	- 2,8	13,8	14,9	4
5	19,9	- 0,485	- 48,7	3	16,9	70,5
6	11,3	- 0,341	- 60,3	0,8	10,5	87,4
7	3,0	- 0,102	- 68	0,1	2,9	98,6
	105,1					Ag : 50

III. Trennungen an Cellulosetriacetat

1. Synthese von Cellulosetriacetat [59)]

200,0 mikrokristallines Cellulosepulver (Avicel^{R}), 4 l Benzol, 800 ml Eisessig, 6 ml Perchlorsäure und 800 ml Acetanhydrid wurden in der genannten Reihenfolge zusammengegeben und drei Tage bei 35 ^{o}C gerührt. Die Suspension wird durchscheinend und färbt sich dunkel. Dann wurde abzentrifugiert und erneut dreimal bis zur Neutralität in Methanol suspendiert, zentrifugiert und bei 30^{o} getrocknet. Die hellbraunen, spröden Klumpen (230,0) wurden in einer Mörsermühle gemahlen und durch Sieb 100 µm geschlagen. Anschließend wurde die Korngrößenfraktion 90 - 56 µm ausgesiebt und zur Säulenchromatographie verwendet.

Das Produkt löste sich klar in chlorierten Kohlenwasserstoffen wie Methylenchlorid und Chloroform. Die Acetylierung war demnach vollständig verlaufen. Das Celluloseacetat enthält 45 % Acetylreste. Es ist ein hellgelbes Pulver, das aus der Raumluft bis zu 3 % Wasser anzieht.

Packen der Trennsäule 85 x 2,5 cm

210,0 Cellulosetriacetat wurden in 500 ml 95 % Ethanol aufgekocht. Nach fünfzehn Minuten ließ man erkalten und pipettierte überschüssiges Lösungsmittel mit etwas Trub ab. Das gequollene Gel wurde kurz an der Wasserstrahlpumpe evakuiert, um eingeschlossene Luft zu entfernen. Dann wurde die dickflüssige Suspension zügig in die Säule gegossen und das Gelbett unter 2,5 bar Druck verdichtet. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis die Säule gefüllt war.

2. Trögersche Base (19)

Schmp. Lit. [51]: 135 - 137 °C
Schmp. gef. [55]: 136 °C

(-)-Enantiomer : $[\alpha]_{365} = -1160^{\circ}$ [51]
$[\alpha]_{589} = -274^{\circ}$

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 24/19	3	205	85 x 2,5	148,5	150,5	101,3	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 24/19	70	700	46 x 20	UV 244	365 589	2 Hxn	d	100

Die Fraktionen des (-)- und (+)-Enantiomeren wurden jeweils zusammengefaßt und aus Petrolether umkristallisiert.

1. (-)-Antipode : 54,1 mg
2. (+)-Antipode : 65,4 mg

1. 6,3 mg in 2 ml n-Hexan $\alpha_{365} = -3,717 \;\hat{=}\; [\alpha]_{365} = -1180^{\circ}$
$\alpha_{589} = -0,882 \;\hat{=}\; [\alpha]_{589} = -280^{\circ}$

2. 4,4 mg in 2 ml n-Hexan $\alpha_{365} = +2,563 \;\hat{=}\; [\alpha]_{365} = +1165^{\circ}$
$\alpha_{589} = +0,610 \;\hat{=}\; [\alpha]_{589} = +277,3^{\circ}$

3. α-substituierte Phenylacetamide 20

a) Mandelamid (20a)

Schmp. Lit. [60]: 132 °C
Schmp. gef. [55]: 133 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365}$ = + 245 ° (MeOH) [55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 25/20a	3	205	85 x 2,5	182,5	172,3	94,4	10C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 25/20a	50	420	7 x 20	UV 259	365	5 MeOH	R	92,9

Frakt.-Nr.	E S	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_R	m_S	Ai
1	29,2	+ 1,420	+ 243,2	0	29,2	99,3
2	42,6	+ 2,085	+ 244,7	0	42,6	100
3	14,4	+ 0,605	+ 210,1	1	13,4	85,8
4	25,1	- 0,987	- 196,6	22,6	2,5	80,2
5	35,6	- 1,626	- 228,4	34,4	1,2	93,2
6	17,6	- 0,812	- 230,7	17,1	0,5	94,2
7	7,8	- 0,309	- 198,1	7	0,8	80,9
	172,3					Ag: 92,9

b) O-Methylmandelamid (20b)

Schmp. Lit.[61] : 113 - 114 °C
Schmp. gef.[55] : 113 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{589}$ = + 104,1 ° (Acn)[55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 26/20b	3	205	85 x 2,5	180,5	181,2	110,4	10C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 26/20b	50	440	10 x 29	UV 256,5	365	—	R	80,5

1 Skt = 0,1 mg/ml
1 cm = 29 ml
s = 2,9

$$f = \frac{[\alpha]_{589}}{[\alpha]_{365}} = 0,315$$

Der Drehwert in ETOH ist mit dem Wert in Acn identisch.

Frakt. Nr.	E S	α_{365}	α_{589}	$[\alpha]_{365}$	$[\alpha]_{589}$	m_R	m_S	Ai
1	18,1	+ 0,202	+ 0,064	323,6	102	0,2	17,9	98
2	32,6	+ 0,347	+ 0,109	308,7	97,3	1,1	31,5	93,5
3	23,2	+ 0,220	+ 0,069	275	86,6	2	21,2	83,2
4	18,8	- 0,020	- 0,006	30,9	9,7	10,2	8,6	9,3
5	22,5	- 0,230	- 0,072	296,4	93,4	21,3	1,2	89,7
6	25,4	- 0,255	- 0,080	291,1	91,7	23,8	1,6	88,1
7	20,3	- 0,200	- 0,063	285,7	90,0	18,9	0,4	86,5
8	13,0	- 0,120	- 0,038	267,7	84,3	11,8	1,2	81
9	5,8	- 0,053	- 0,017	265	83,5	5,3	0,5	80,2
10	1,5	- 0,015	- 0,005	290	91,4	1,4	0,1	87,8
	181,2							Ag : 80,5

c) O-Acetylmandelamid (20c)

Schmp. Lit. [62] : 112 - 113 °C

Schmp. gef. [55] : 112 °C

(R)-Enantiomer : $[\alpha]_{365}$ = - 523° (ETOH) [55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 27/20c	3	205	85x2,5	38,7	37,1	95,8	5C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 27/20c	50	420	10x13,7	UV 257	365	—	R	25,4

1 Skt = 0,044 mg/ml

1 cm = 13,7 ml

s = 0,6

Frakt.-Nr.	ES	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_R	m_S	Ai
1	1,4	+ 0,063	+ 577	0	1,4	100
2	4,1	+ 0,080	+ 267,3	1	3,1	51,1
3	5,9	+ 0,030	+ 70	2,6	3,3	13,4
4	6	- 0,014	- 30,8	3,2	2,8	5,9
5	5,3	- 0,032	- 82,7	3	2,3	15,8
6	4,4	- 0,037	- 115,2	2,7	1,7	22
7	3,7	- 0,036	- 133,3	2,3	1,4	25,5
8	3	- 0,032	- 146	1,9	1,1	28
9	2,1	- 0,026	- 169,6	1,4	0,7	32,4
10	1,2	- 0,020	- 228,3	0,9	0,3	43,7
	37,1					Ag: 25,4

d) Tropasäureamid (20d)

Schmp. Lit.[63] : 170 - 171 °C
Schmp. gef.[55] : 170 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{589}$ = - 54,7° (MeOH)[55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 28/20d	3	205	85x2,5	60,4	59,9	99,2	5C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 28/20d	50	320	5x22,7	UV 257	589	—	R	31,3

1 Skt = 0,058 mg/ml
1 cm = 22,7 ml
s = 1,3

Der Drehwert in ETOH ist mit dem Wert in MeOH identisch.

Frakt.-Nr.	ES	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	m_R	m_S	Ai
1	4,6	- 0,011	- 54,3	0	4,6	100
2	18,2	- 0,013	- 16,2	6,4	11,8	29,6
3	22,8	+ 0,006	+ 6	12,6	10,2	11
4	11,7	+ 0,010	+ 19,4	7,9	3,8	35,5
5	2,6	+ 0,005	+ 43,7	2,3	0,3	79,9
	59,9					Ag : 31,3

e) Atrolactinsäureamid (20 e)

Schmp. Lit. [64] : 101 - 102 °C
Schmp. gef. [55] : 101 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{546}$ = - 14,5 ° (Acn) [55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 29/20 e	3	205	85 x 2,5	200,4	200,1	100	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 29/20 e	50	420	10 x 8,2	UV 255	365	—	R	42,6

1 Skt = 0,1 mg/ml
1 cm = 8,2 ml
s = 8,82

$$f = \frac{[\alpha]_{546}\ \text{Acn}}{[\alpha]_{365}\ \text{ETOH}} = 0,29$$

Frakt.-Nr.	E S	α_{365}	α_{546}	$[\alpha]_{365}$	$[\alpha]_{546}$	m_R	m_S	Ai
1	4,1	- 0,025	- 0,007	- 50	- 14,5	0	4,1	100
2	16,8	- 0,085	- 0,024	- 41,5	- 41,5	1,6	15,2	82,8
3	32,8	- 0,100	- 0,029	- 25	- 7,3	8,2	24,6	50,3
4	40,2	- 0,040	- 0,012	- 8,2	- 2,4	16,7	23,5	16,6
5	36,9	+ 0,030	+ 0,008	+ 6,7	+ 1,9	20,7	16,2	13
6	28,7	+ 0,065	+ 0,019	+ 18,5	+ 5,4	19,7	9	37,3
7	19,7	+ 0,065	+ 0,019	+ 27	+ 7,8	15,2	4,5	53,8
8	11,9	+ 0,055	+ 0,016	+ 37,9	+ 11	10,5	1,4	75,9
9	6,2	+ 0,040	+ 0,012	+ 52,9	+ 15,3	6,2	0	100
10	2,8	+ 0,020	+ 0,006	+ 58,5	+ 16,9	2,8	0	100
	200,1							Ag: 42,6

4. Benzoylaminosäureethylester 21

a) N-Benzoylphenylglycinethylester (21 a)

Schmp. Lit.[65] : 89 °C
Schmp. gef.[55] : 86 - 87 °C

(R)-Enantiomer : $[\alpha]_{589}$ = - 89 ° (ETOH)[55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 30/21a	3	205	85 x 2,5	127,0	124,7	98,2	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 30/21 a	50	420	5 x 31,7	UV 260	589	—	R	42,8

1 Skt = 0,02 mg/ml
1 cm = 31,7 ml
s = 0,63

Frakt.-Nr.	ES	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	m_R	m_S	Ai
1	23,6	+ 0,050	67,1	2,9	20,7	75,4
2	45,6	+ 0,050	34,8	13,9	31,7	39,1
3	34,7	- 0,015	13,7	20	14,7	15,4
4	16,4	- 0,025	48,3	12,7	3,7	54,3
5	4,4	- 0,010	72,0	4	0,4	80,9
	124,7					Ag: 42,8

b) N-Benzoylphenylalaninethylester (21 b)

Schmp. Lit. [66]: 94 - 95 °C
Schmp. gef. [55]: 94 °C

(S)-Enantiomer: $[\alpha]_{365}$ = - 161,4 ° (MeOH) [55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 31/21 b	3	205	85 x 2,5	114	113,4	100	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 31/21 b	50	420	9 x 14	UV 250	365	—	R	25,9

1 Skt = 0,084 mg/ml
1 cm = 14 ml
s = 1,17

Der Drehwert in ETOH ist mit dem Wert in MeOH identisch.

Frakt.-Nr.	E S	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_R	m_S	Ai
1	2,3	- 0,026	- 158,3	0	2,3	98
2	9,3	- 0,066	- 99,4	1,8	7,5	61,6
3	18,7	- 0,058	- 43,4	6,9	11,8	26,9
4	24,5	- 0,010	- 5,7	11,8	12,7	3,5
5	23,4	+ 0,041	+ 24,5	13,5	9,9	15,2
6	17,6	+ 0,061	+ 48,5	11,4	6,2	30
7	10,5	+ 0,046	+ 61,3	7,2	3,3	38
8	5,3	+ 0,023	+ 60,8	3,6	1,7	37,6
9	1,8	+ 0,008	+ 62,2	1,2	0,6	38,5
	113,4					Ag: 25,9

c) N-Benzoyltyrosinethylester (21 c)

Schmp. Lit. [56] : 123 - 124 °C
Schmp. gef. [55] : 124 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365} = -136,9^{\circ}$ (MeOH) [55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 32/21 c	3	205	85 x 2,5	84,9	85	100	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 32/21 c	50	400	8 x 20	UV 275	365	—	—	0

5. Substituierte Acetamide 22

a) N-Acetylphenylethylamin (22 a)

Schmp. Lit.[67] : 75 °C
Schmp. gef.[55] : 75 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{589}$ = - 150° (ETOH)[55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 33/22 a	3	205	85 x 2,5	208,1	206,0	99	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 33/22 a	50	280	6 x 15,3	UV 255	589	—	R	43,6

1 Skt = 0,05 mg/ml
1 cm = 15,3 ml
s = 0,76

Frakt.-Nr.	ES	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	m_R	m_S	Ai
1	8	- 0,075	- 143,4	0,2	7,8	- 95,6
2	32,7	- 0,210	- 98,3	5,7	27	- 65,5
3	60,4	- 0,170	- 43	21,5	38,9	- 28,7
4	60,8	+ 0,100	+ 25,1	35,5	25,3	+ 16,7
5	34,2	+ 0,230	+ 102,9	28,8	5,4	+ 68,6
6	9,9	+ 0,110	+ 170	9,9	0	+ 100
	206,0					Ag: 43,6

b) N-Acetyl-1-phenyl-2-methyl-propylamin (22 b)

Schmp. gef. [55] : 118 °C

(R)-Enantiomer : $[\alpha]_{589}$ = + 131 ° (MeOH) [68]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 34/22 b	3	205	85 x 2,5	180,0	175,9	97,7	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 34/22 b	50	280	7 x 26,7	UV 256,5	589	—	R	92,5

1 Skt = 0,066 mg/ml
1 cm = 26,7 ml
s = 1,76

Der Drehwert in ETOH ist mit dem Wert in MeOH identisch.

Frakt.-Nr.	E S	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	m_R	m_S	Ai
1	35,2	- 0,175	- 132,7	0	35,2	100
2	41,3	- 0,190	- 123	1,3	40	93,9
3	24,6	+ 0,075	+ 81,4	19,9	4,7	62,1
4	36,1	+ 0,180	+ 133,1	36,1	0	100
5	26,4	+ 0,125	+ 126,4	25,9	0,5	96,5
6	10,5	+ 0,050	+ 127,1	10,3	0,2	97
7	1,8	+ 0,010	+ 148	1,8	0	100
	175,9					Ag: 92,5

c) N-Acetyl-α-cyan-benzylamin (22 c)

Schmp. Lit.[69] : 113 °C
Schmp. gef.[55] : 113 °C

(R)-Enantiomer : $[\alpha]_{589} = -21,65^{\circ}$ ($CHCl_3$)[55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 35/22 c	3	205	85 x 2,5	193	192,1	100	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 35/22 c	50	400	5 x 20	g[+)]	589	2 $CHCl_3$	S	7,3

[+)] korrigierte Masse, abzüglich eluierter Acetylcellulose

Frakt.-Nr.	ES	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	m_R	m_S	Ai
1	12,7	- 0,049	- 7,7	8,6	4,1	35,6
2	50,7	- 0,037	- 1,5	27	23,7	6,9
3	74,1	- 0,000	- 0	37	37	0
4	42,9	+ 0,029	+ 1,4	20,1	22,8	6,5
5	11,7	+ 0,035	+ 6	4,2	7,5	27,7
	192,1					Ag: 7,3

6. Cyanessigsäureamide 23

a) Phenylethylcyanessigsäureamid (23 a)

Schmp. gef. : 119 °C

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 36/23 a	3	205	85 x 2,5	101,6	98,5	97	8 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V 36/23 a	50	540	16 x 20	g	365 589	2 ETOH	d	100	2,6	2,9

Die Fraktionen des (-)-Enantiomeren wurden jeweils zusammengefaßt und aus Petrolether/ETOH umkristallisiert.

(-)-Enantiomer:
9,606 mg in 2 ml ETOH $\alpha^{22}_{589} = -0,096^{\circ}$, $[\alpha]^{22}_{589} = -20^{\circ}$

$\alpha^{22}_{365} = -0,335^{\circ}$, $[\alpha]^{22}_{365} = -69,7^{\circ}$

(+)-Enantiomer:
7,937 mg in 2 ml ETOH $\alpha^{22}_{589} = +0,079^{\circ}$, $[\alpha]^{22}_{589} = +19,9^{\circ}$

$\alpha^{22}_{365} = +0,277^{\circ}$, $[\alpha]^{22}_{365} = +69,8^{\circ}$

(-)-Enantiomer : 39 mg Schmp. : 103 °C
(+)-Enantiomer : 37 mg Schmp. : 103 °C

b) Cyclohexenylmethylcyanessigsäureamid (23 b)

Schmp. gef. : 115 °C

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 37/23 b	3	205	85 x 2, 5	148, 2	149, 3	100, 7	10 C	C	2, 5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 37/23 b	50	360	8 x 14	RI	365	—	d	48, 7

1 Skt = 0, 03 mg/ml
1 cm = 28, 1 ml
s = 0, 84
5 mm = 1 Frakt. $\frac{s}{2}$ = 0, 42

[α] unbekannt, es wurden die Drehwerte von Frakt. 1 und 7 zur Berechnung von Ai verwendet.

Frakt.-Nr.	E S	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_d	m_l	Ai
1	6, 3	- 0, 051	- 113, 3	0	6, 3	100
2	15, 9	- 0, 107	- 94, 2	1, 4	14, 5	83, 4
3	26, 8	- 0, 108	- 56, 4	6, 8	20	49, 9
4	34, 2	- 0, 028	- 11, 5	15, 4	18, 8	10, 1
5	30	+ 0, 078	+ 36, 4	19, 8	10, 2	32, 2
6	24	+ 0, 118	+ 68, 8	19, 3	4, 7	60, 9
7	9, 6	+ 0, 077	+ 112, 3	9, 6	0	100
8	2, 5	+ 0, 025	+ 140	2, 5	0	100
	149, 3					Ag: 48, 7

7. Carbonsäuren 24

Phenylethylcyanessigsäure (24)

(-)-Enantiomer : $[\alpha]_{589} = -17,0^{\circ}$ (ETOH) [39]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 38/24	3	205	85 x 2,5	129,3	130	100	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 38/24	50	360	5 x 20	g [+)]	589	—	—	0

[+)] korrigierte Masse

8. Benzoinderivate 25

a) Benzoin (25 a)

Schmp. Lit. [70] : 134 - 135 °C
Schmp. gef. [55] : 135 °C

(R)-Enantiomer : $[\alpha]_{436}$ = - 522,3 ° ($CHCl_3$) [55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 39/25 a	3	205	85 x 2,5	50	49,1	100	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 39/25 a	50	640	11 x 20	g +)	436	5 $CHCl_3$	S	42

+) korrigierte Masse

Frakt.-Nr.	E S	α_{436}	$[\alpha]_{436}$	m_R	m_S	Ai
1	0,8	- 0,060	- 375	0,6	0,2	71,8
2	3,0	- 0,243	- 405	2,4	0,6	77,6
3	5,3	- 0,405	- 382,1	4,6	0,7	73,2
4	9,0	- 0,364	- 202,2	6,2	2,8	38,7
5	9,1	- 0,071	- 39	4,9	4,2	7,5
6	7,2	+ 0,159	+ 110,4	2,8	4,4	21,1
7	5,5	+ 0,245	+ 222,7	1,9	3,6	43
8	3,9	+ 0,241	+ 308,9	0,8	3,1	59,2
9	1,8	+ 0,213	+ 591,7	0	1,8	100
10	2,3	+ 0,127	+ 276,1	0,5	1,8	52,9
11	1,2	+ 0,088	+ 220	0,3	0,9	42,1
	49,1					Ag: 42

b) O-Methylbenzoin (25 b)

Schmp. Lit.[71] : 49 °C
Schmp. gef.[55] : 49 °C

(R)-Enantiomer : $[\alpha]_{546} = +140^{\circ}$ (CCl_4)[55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 40/25 b	3	205	85 x 2,5	238,4	237,1	100	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 40/25 b	50	400	10 x 20	g[+)]	546	5 CCl_4	S	14,6

[+)] korrigierte Masse

Frakt.-Nr.	E S	α_{546}	$[\alpha]_{546}$	m_R	m_S	Ai
1	13,6	+ 0,148	+ 54,4	9,4	4,2	38,8
2	39,2	+ 0,220	+ 28,0	23,5	15,7	20
3	57,1	+ 0,175	+ 15,3	31,6	25,5	10,9
4	47,2	- 0,030	- 3,2	23,1	24,1	2,3
5	32,4	- 0,089	- 13,7	14,6	17,8	9,8
6	21,9	- 0,103	- 23,5	9,1	12,8	16,8
7	14,4	- 0,087	- 30,2	5,7	8,7	21,5
8	7,2	- 0,066	- 45,8	2,5	4,7	32,7
9	3,0	- 0,033	- 55	0,9	2,1	39,3
10	1,1	- 0,016	- 72,7	0,3	0,8	51,9
	237,1					Ag: 14,6

c) O-Acetylbenzoin (25 c)

Schmp. Lit. [72] : 82 °C
Schmp. gef. [55] : 80 - 81 °C

(R)-Enantiomer : $[\alpha]_{589} = -217,7^{\circ}$ ($CHCl_3$) [55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 41/25 c	3	85 x 2,5	205	264,5	232,2	87,8	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 41/25 c	50	540	17 x 20	g [+)]	589	5 $CHCl_3$	R	82,8

[+)] korrigierte Masse

Frakt.-Nr.	ES	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	m_R	m_S	Ai
1	9,9	+ 0,374	+ 188,9	0,7	9,2	86,8
2	19,7	+ 0,787	+ 199,7	0,8	18,9	91,7
3	28,2	+ 1,119	+ 198,4	1,3	26,9	68,1
4	26,4	+ 1,062	+ 201,1	1	25,4	92,3
5	17,8	+ 0,673	+ 189,0	1,2	16,6	86,8
6	11,2	+ 0,330	+ 147,3	1,8	9,4	67,6
7	11,7	+ 0,120	+ 51,3	4,5	7,2	23,5
8	15,3	- 0,490	- 160,1	13,3	2	73,7
9	19,2	- 0,758	- 204,4	18,7	0,5	93,9
10	20,1	- 0,795	- 197,8	19,2	0,9	90,9
11	16,3	- 0,673	- 206,4	15,9	0,4	94,8
12	11,7	- 0,490	- 209,4	11,5	0,2	96,2
13	8,4	- 0,360	- 214,3	8,4	0	98,4
14	6,9	- 0,249	- 180,4	6,3	0,6	82,8
15	4,0	- 0,168	- 210,0	3,9	0,1	96,4
16	3,3	- 0,112	- 169,7	2,9	0,4	77,9
17	2,1	- 0,069	- 164,3	1,8	0,3	75,4
	232,2					Ag: 82,8

9. Piperidindione

a) Glutethimid (9)

Schmp. Lit. [58] : 85 - 88 °C
Schmp. gef. : 86 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365}$ = - 625, 8 (MeOH) [12]

$[\alpha]_{365}$ = - 638, 3 (ETOH)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 42/9	3	85 x 2,5	205	214, 9	214, 6	100	10 C	C	2, 5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 42/9	50	680	23 x 12, 4	UV 257, 5	365	—	R	86, 7

Tabelle : siehe theoretischer Teil

b) Methyprylon (Noludar^{R}) (26)

Schmp. Lit. [58]: 74 - 77 °C

Schmp. gef. : 74 °C

(+)-Enantiomer: $[\alpha]_{365}$ = + 674 ° (MeOH) [12]

(-)-Enantiomer: $[\alpha]_{365}$ = - 641 °

Der Drehwert in MeOH ist mit dem Wert in ETOH identisch.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 43/26	3	85 x 2,5	205	110,8	109,2	98,6	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 43/26	50	320	5 x 27,7	RI	365	—	1	22,7

1 Skt = 0,033 mg/ml

1 cm = 27,7 ml

s = 0,9

Frakt.-Nr.	ES	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_d	m_l	Ai
1	5,4	- 0,100	+ 512,9	4,8	0,6	76
2	39,6	- 0,265	+ 185,3	25,2	14,4	27,5
3	47,2	+ 0,075	- 44	22	25,2	6,8
4	14,8	+ 0,140	- 262	4,4	10,4	40,8
5	2,2	+ 0,015	- 180	0,8	1,4	28
	109,2					22,7

10. Hydantoine

Mephenytoin (Mesantoin^{R}) (27)

Schmp. Lit.[58] : 137 - 138 °C

Schmp. gef. : 137 °C

(-)-Enantiomer : $[\alpha]_{365}$ = - 416,7 (ETOH)[12]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 44/27	3	85 x 2,5	205	200,7	199	99,2	10 C	C	2,5

	11	12	13	14	15	16	17	18
V 44/27	50	440	9 x 13,6	UV 255	365	—	1	67,7

1 Skt = 0,094 mg/ml

1 cm = 13,6 ml

s = 1,28

Frakt.-Nr.	ES	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_d	m_l	Ai
1	16	+ 0,450	+ 382,5	15,3	0,7	91,8
2	31	+ 0,950	+ 416,7	31	0	100
3	32,7	+ 0,700	+ 291,2	27,7	5	69,9
4	33,3	- 0,090	- 36,8	15,2	18,1	8,6
5	32,6	- 0,565	- 235,7	7,1	25,5	56,6
6	25,1	- 0,575	- 311,6	3,2	21,9	74,8
7	15,7	- 0,420	- 363,8	1	14,7	87,3
8	8,3	- 0,255	- 417,8	0	8,3	100
9	4,3	- 0,123	- 389	0,2	4,1	93,4
	199					Ag: 67,7

11. Succinimide

a) Mesuximid (28)

Schmp. Lit.[73]: 52 - 54 °C
Schmp. gef. : 52 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{589} = -24,2^{\circ}$ (MeOH)

$[\alpha]_{365} = -54,6^{\circ}$ (ETOH)

$$f = \frac{[\alpha]_{589}\,(\text{MeOH})}{[\alpha]_{365}\,(\text{ETOH})} = 0,443$$

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 45/28	3	85 x 2,5	205	215	217,4	101	10C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 45/28	50	760	14 x 11 12 x 22	UV 256	365	—	S	86,9

1 Skt = 0,032 mg/ml
1 cm = 11 ml
s = 0,35

Zur Auswertung des (S)-Antipoden wurden jeweils 2 Fraktionen zusammengefaßt (22 ml).

Frakt.-Nr.	ES	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_R	m_S	Ai
1	2,3	+ 0,015	+ 72,5	2,3	0	100
2	4,7	+ 0,031	+ 72,5	4,7	0	100
3	6,3	+ 0,040	+ 70,5	6,3	0	100
4	7,1	+ 0,045	+ 69,9	7,1	0	100
5	7,4	+ 0,046	+ 68,3	7,4	0	100
6	7,4	+ 0,046	+ 68,3	7,4	0	100
7	7,4	+ 0,046	+ 68,3	7,4	0	100
8	7,3	+ 0,045	+ 67,8	7,3	0	100
9	7,1	+ 0,043	+ 66,8	7,1	0	100
10	6,9	+ 0,041	+ 65,6	6,9	0	100
11	6,7	+ 0,039	+ 64,5	6,7	0	100
12	6,3	+ 0,036	+ 63,6	6,3	0	100
13	5,9	+ 0,034	+ 62,6	5,9	0	100
14	5,4	+ 0,031	+ 62,7	5,4	0	100
15	11,2	+ 0,019	+ 34,7	7,5	3,7	63,6
16	12,6	0,000	0	6,3	6,3	0
17	12,6	- 0,014	- 21,7	4,9	7,7	39,7
18	12,2	- 0,022	- 38,7	3,9	8,3	70,4
19	11,4	- 0,027	- 51,5	3	8,4	94,3
20	11,2	- 0,030	- 58,3	0	11,2	100
21	11,1	- 0,032	- 62,9	0	11,1	100
22	10,8	- 0,031	- 62,7	0	10,8	100
23	10	- 0,029	- 63,7	0	10	100
24	8,7	- 0,025	- 57,9	0	8,7	100
25	7,3	- 0,020	- 61,9	0	7,3	100
26	5,7	- 0,016	- 61,1	0	5,7	100
27	4,4	- 0,012	- 61,5	0	4,4	100
	217,4					86,9

b) Ethosuximid (29)

Schmp. Lit. [36]: 46 °C
Schmp. gef. : 46 °C

(-)-Enantiomer : $[\alpha]_{589} = -32,2^{\circ}$ (MeOH) [36]

$[\alpha]_{365} = -118,8^{\circ}$ (MeOH) [12]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 46/29	3	85 x 2,5	205	263,1	262	99,6	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 46/29	50	460	6 x 20	RI	365	—	—	0

12. Barbiturate

a) Methylphenobarbital (30)

Schmp. Lit.[49]: 178 - 181 °C
Schmp. gef. : 178 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365}$ = + 26,5 ° (ETOH)[39]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 47/30	3	85 x 2,5	205	301	300	100	30 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V 47/30	50	1040	46 x 20	g	365	2 ETOH	S	100	2,3	2,3

Die Fraktionen des (R)- und (S)-Enantiomeren wurden jeweils zusammengefaßt und aus ETOH/H_2O umkristallisiert.

Schmp. Lit.[17]: 101 °C
1. (R)-Enantiomer : 125 mg Schmp. gef. : 100 °C
2. (S)-Enantiomer : 127 mg Schmp. gef. : 100 °C

1. 12,9 mg in 2 ml ETOH α^{22}_{365} = - 0,172 °, $[\alpha]^{22}_{365}$ = - 26,6 °
2. 13,4 mg in 2 ml ETOH α^{22}_{365} = + 0,180 °, $[\alpha]^{22}_{365}$ = + 26,8 °

b) Hexobarbital (31)

Schmp. Lit.[49] : 146 - 147 °C
Schmp. gef. : 145 °C
(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365}^{20}$ = + 41, 0° (ETOH)[39]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 48/31	3	85 x 2,5	205	160, 6	160	100	10 C	C	2,5

2	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V 48/31	50	620	24 x 20	g	365	2 ETOH	S	100	1,7	1,5

Die Fraktionen des (R)- und (S)-Enantiomeren wurden jeweils zusammengefaßt und aus ETOH/H_2O umkristallisiert.

Schmp. Lit.[16] : 153 °C
1. (R)-Enantiomer : 70 mg Schmp. gef. : 152 °C
2. (S)-Enantiomer : 60 mg Schmp. gef. : 151, 5 °C

1. 12, 7 mg in 2 ml ETOH α_{365}^{20} = - 0, 269°, $[\alpha]_{365}^{20}$ = - 42, 3°

2. 7, 6 mg in 2 ml ETOH α_{365}^{20} = + 0, 156° $[\alpha]_{365}^{20}$ = + 41°

c) Methyleudan (32)

Schmp. Lit. [49]: 154 - 156 °C
Schmp. gef. : 154 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365}^{20}$ = + 52,1 ° (ETOH) [39]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 49/32	3	85 x 2,5	205	160	155	96,8	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V 49/32	50	1300	45 x 20	g	365	2 ETOH	S	100	—	—

Nach Elution des (-)-Enantiomeren wurde das Adsorbens auf 40 °C erwärmt.

Die Fraktionen des (R)- und (S)-Enantiomeren wurden jeweils zusammengefaßt und aus ETOH/H_2O umkristallisiert.

Schmp. Lit. : 141 - 143 °C
1. (R)-Enantiomer : 63 mg Schmp. gef. : 141 °C
2. (S)-Enantiomer : 60,5 mg Schmp. gef. : 141 °C

1. 11,6 mg in 2 ml ETOH α_{365}^{20} = - 0,297° $[\alpha]_{365}^{20}$ = - 51,2 °

2. 11,0 mg in 2 ml ETOH α_{365}^{20} = + 0,285° $[\alpha]_{365}^{20}$ = + 51,8 °

d) 1-Methyl-5, 5-phenylpropylbarbitursäure (33)

Schmp. Lit. [49]: 113 - 114 °C

Schmp. gef. : 112 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365} = +25,5^{\circ}$ (ETOH) [74]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 50/33	3	85 x 2,5	205	140	141,8	101,3	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 50/33	50	520	8 x 20	g[+)]	365	2 ETOH	S	47,5

[+)] korrigierte Masse

Frak.-Nr.	E S	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_R	m_S	Ai
1	8,7	- 0,111	- 25,5	8,7	0	100
2	22,6	- 0,220	- 19,5	19,9	2,7	76,5
3	28,1	- 0,121	- 8,5	18,8	9,3	33,7
4	29,5	+ 0,052	+ 3,5	12,7	16,8	13,7
5	23,2	+ 0,115	+ 9,9	7,1	16,1	38,8
6	16,3	+ 0,111	+ 13,6	3,8	12,5	53,3
7	8,9	+ 0,079	+ 17,8	1,4	7,5	69,8
8	4,5	+ 0,050	+ 22,2	0,3	4,2	87,1
	141,8					Ag: 47,5

e) Methylcyclobarbital (34)

Schmp. Lit. [49]: 110 - 111 °C
Schmp. gef. : 111 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365}$ = + 20,5 ° (ETOH) [39]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 51/34	3	85 x 2,5	205	208,7	205	98,2	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V 51/34	50	520	24 x 20	g	365	2 ETOH	S	100	—	1,7

Die Fraktionen des (R)- und (S)-Enantiomeren wurden jeweils zusammengefaßt und aus ETOH/H_2O umkristallisiert.

Schmp. Lit. : 121 - 123 °C
1. (R)-Enantiomer : 83 mg Schmp. gef. : 121 °C
2. (S)-Enantiomer : 80 mg Schmp. gef. : 122 °C

1. 10,8 mg in 2 ml ETOH α^{20}_{365} = - 0,114 °, $[\alpha]^{20}_{365}$ = - 21,1 °

2. 10,4 mg in 2 ml ETOH α^{20}_{365} = + 0,109 °, $[\alpha]^{20}_{365}$ = + 21 °

f) 1, 5-Dimethyl-5-cyclohexylbarbitursäure (35)

Schmp. Lit.[49]: 155 - 156 °C

Schmp. gef. : 155 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365}$ = + 41, 8 ° (ETOH)[45]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 52/35	3	85 x 2, 5	205	200	195	97, 5	10 C	C	2, 5

1	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V 52/35	50	540	21 x 20	g	365	2 ETOH	S	100	1, 9	1, 5

Die Fraktionen des (R)- und (S)-Enantiomeren wurden jeweils zusammengefaßt und aus ETOH/H_2O umkristallisiert.

Schmp. Lit. : 182 °C

1. (R)-Enantiomer : 87 mg Schmp. gef. : 180 °C

2. (S)-Enantiomer : 80 mg Schmp. gef. : 179 °C

1. 10, 3 mg in 2 ml ETOH α^{20}_{365} = - 0, 222 °, $[\alpha]^{20}_{365}$ = - 43, 1 °

2. 12 mg in 2 ml ETOH α^{20}_{365} = + 0, 255 °, $[\alpha]^{20}_{365}$ = + 42, 5 °

g) 1-Methyl-5, 5-cyclohexylethylbarbitursäure (36)

Schmp. Lit. [49] : 116 °C
Schmp. gef. : 116 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365}$ = + 20, 3 ° (ETOH) [45]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 53/36	3	85 x 2, 5	205	200, 2	200	100	10 C	C	2, 5

1	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V 53/36	50	440	23 x 20	g	365	2 ETOH	S	100	2, 4	1, 7

Die Fraktionen des (R)- und (S)-Enantiomeren wurden jeweils zusammengefaßt und aus ETOH/H_2O umkristallisiert.

Schmp. Lit. [85] : 154 °C
1. (R)-Enantiomer : 79 mg Schmp. gef. : 152 °C
2. (S)-Enantiomer : 80 mg Schmp. gef. : 153 °C

1. 10, 2 mg in 2 ml ETOH α^{20}_{365} = - 0, 105 °, $[\alpha]^{20}_{365}$ = - 20, 6 °

2. 10 mg in 2 ml ETOH α^{20}_{365} = + 0, 100 °, $[\alpha]^{20}_{365}$ = + 20 °

h) 1-Methyl-5, 5-cyclopentenyl-ethylbarbitursäure (37)

Schmp. Lit. [49]: 129 - 130 °C

Schmp. gef. : 129 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365} = +25,6^{\circ}$ (ETOH) [74]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 54/37	3	85 x 2,5	205	257,3	258,6	100,5	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 54/37	50	440	10 x 20	g +)	365	2 ETOH 4 ETOH	S	68,2

+) korrigierte Masse

Frakt.-Nr.	ES	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m_R	m_S	Ai
1	1,5	- 0,019	25,3	1,5	0	100
2	17,9	- 0,216	24,1	17,4	0,5	94
3	38,5	- 0,540	28	38,5	0	100
4	52	- 0,243 +)	18,7	45	7	73
5	44	- 0,020 +)	1,8	23,5	20,5	7
6	41,1	+ 0,138 +)	13,4	9,8	31,3	52,3
7	32,7	+ 0,168 +)	20,5	3,2	29,5	80
8	20	+ 0,140 +)	28	0	20	100
9	9,4	+ 0,060 +)	25,5	0	9,4	100
10	1,5	+ 0,019	25,3	0	1,5	100
	258,6					Ag: 68,2

+) 4 ml ETOH

i) 1-Methyl-5, 5-ethylpropylbarbitursäure (38)

Schmp. Lit.[49]: 99 - 100 °C
Schmp. gef. : 100 °C
(+)-Enantiomer : $[\alpha]_{589} = +1,2^{\circ}$ (ETOH)[75]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 55/38	3	85x2,5	205	105,3	100	95	10C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 55/38	50	400	5x20	g	365	—	—	0

j) Vinylbital (39)

Schmp. Lit.[38]: 86 °C
Schmp. gef. : 85 °C
(-)-Enantiomer : $[\alpha]_{365} = -28,4^{\circ}$ (ETOH)[38]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 56/39	3	85x2,5	205	248,6	250	100,5	10C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 56/39	50	380	6x20	g	365	—	—	0

13. Cyanessigsäuremethylester 40

a) Phenylmethylcyanessigsäuremethylester (40a)

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365} = +117,1^{o}$ (ETOH) [39]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 57/40a	3	85x2,5	205	219,9	220	100	10C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V 57/40a	50	620	31x20	g	365	2 ETOH	S	100	1,8	1,6

Die Fraktionen des (R)- und (S)-Enantiomeren wurden jeweils zusammengefaßt und im Kugelrohrofen bei Hochvakuum destilliert.

1. (R)-Enantiomer: 70 mg
2. (S)-Enantiomer : 57 mg

1. 10,7 mg in 2 ml ETOH $\alpha_{365} = -0,631^{o}$, $[\alpha]_{365} = -117,9^{o}$

2. 9,3 mg in 2 ml ETOH $\alpha_{365} = +0,551^{o}$, $[\alpha]_{365} = +118,5^{o}$

b) Phenylethylcyanessigsäuremethylester (40b)

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{365} = +143,7^{o}$ (ETOH) [39)]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 58/40b	3	85x2,5	205	230	220	95,6	10C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
V 58/40b	50	760	20x20	g	365	2 ETOH	S	100	1,5	1

Die Fraktionen des (R)- und (S)-Enantiomeren wurden jeweils zusammengefaßt und im Kugelrohrofen bei Hochvakuum destilliert.

1. (R)-Enantiomer : 61 mg
2. (S)-Enantiomer : 53 mg

1. 10,2 mg in 2 ml ETOH $\alpha_{365}^{22} = -0,740^{o}$, $[\alpha]_{365}^{22} = -145,1^{o}$

2. 9,8 mg in 2 ml ETOH $\alpha_{365}^{22} = +0,705^{o}$, $[\alpha]_{365}^{22} = +143,8^{o}$

c) Phenylbutylcyanessigsäuremethylester (40c)

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{589} = +39,2^{o}$ (ETOH)[46]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 59/40c	3	85x2,5	205	190,9	189,8	100	10C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 59/40c	50	360	5x27,7	UV 257	589	—	S	36,4

1 Skt = 0,034 mg/ml
1 cm = 27,7 ml
s = 0,94

Frakt.-Nr.	ES	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	m_R	m_S	Ai
1	18,8	- 0,021	- 30,9	16,8	2	78,8
2	61,1	- 0,021	- 9,5	38	23,1	24,2
3	69	+ 0,023	+ 9,2	26,4	42,6	23,5
4	32,9	+ 0,028	+ 23,5	6,6	26,3	59,9
5	8	+ 0,005	+ 17,3	2,3	5,7	44,1
	189,8					36,4

14. Weitere Pharmaka

a) Chloroquin (41)

Schmp. Lit.[58]: 87 - 88 °C
Schmp. gef. : 87 - 88 °C

(+)-Enantiomer : $[\alpha]_{436}^{22}$ = + 274,1 ° (ETOH)[12]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 60/41	3	85x2,5	205	164	160	97,5	10C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 60/41	50	300	10x20	g	436	—	—	0

b) Phenprocoumon (11)

Schmp. Lit.[16]: 170 - 171 °C
Schmp. gef. : 170 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{589}$ = - 122,6 ° (ETOH)[16]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 61/11	3	85 x 2,5	205	101,5	100	98,5	10C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 61/11	50	260	6x20	UV 315	589	—	—	0

c) Atropin (42)

Schmp. Lit.[76] : 116 °C

Schmp. gef. : 116 °C

(S)-Enantiomer : $[\alpha]_{589}$ = - 21 ° (ETOH)[55]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 62/42	3	85x2,5	205	106,5	37,2	35	10C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 62/42	50	300	7x7,7	UV 258	589	—	R	38,4

1 Skt = 0, 052 mg/ml

1 cm = 7, 7 ml

s = 0, 4

Frakt.-Nr.	E S	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	m_R	m_S	Ai
1	3, 2	- 0, 007	- 16, 8	0, 3	2, 9	80
2	5, 8	- 0, 010	- 13, 3	1, 1	4, 7	63, 3
3	8, 2	- 0, 010	- 9, 4	2, 3	5, 9	44, 7
4	8, 8	- 0, 003	- 2, 6	3, 8	5	12, 4
5	6, 6	+ 0, 003	+ 3, 5	3, 9	2, 7	16, 7
6	3, 4	+ 0, 003	+ 6, 8	2, 3	1, 1	32, 4
7	1, 2	+ 0, 003	+ 19, 3	1, 1	0, 1	92
	37, 2					Ag: 38, 4

d) Phenylpropanol (43)

(+)-Enantiomer : $[\alpha]_{589} = +27,3^{o}$ (ETOH) [12)]

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 63/43	3	85 x 2,5	205	200,3	200	100	10 C	C	2,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 63/43	50	320	6 x 20	g	589	—	—	0

IV. Recyclingchromatographie und HPLC

1. Quantitative Trennung von Mandelamid durch Recyclingchromatographie

Mandelamid (20a)

Schmp. Lit.[60] : 122 - 123 °C

Schmp. gef.[55] : 122 °C

(R)-Enantiomer : $[\alpha]_{365} = -245^{\circ}$ (c = 0,7 MeOH)[55]

Daten nach einmaligem Durchlauf durch die Säule.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 65/20a	1	250	76 x 3,2	293,3	288,2	98,3	20 B	B	1,5

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 65/20a	30	1840	21 x 20	g	365	5 MeOH	S	82,8

Frakt.-Nr.	ES	α_{365}	$[\alpha]_{365}$	m	m	Ai
1	4,6	- 0,214	- 232,6	0,1	4,5	95
2	15	- 0,686	- 228,7	0,5	14,5	93,3
3	25,8	- 1,197	- 232	0,7	25,1	94,7
4	25,0	- 1,142	- 228,4	0,8	24,2	93,2
5	21,2	- 0,991	- 233,7	0,5	20,7	95,4
6	17,3	- 0,762	- 220,2	0,9	16,4	89,9
7	13,5	- 0,566	- 209,6	1,0	12,5	85,6
8	11,8	- 0,369	- 156,4	2,1	9,7	63,8
9	11,3	- 0,064	- 28,3	5,0	6,3	11,6
10	13,6	+ 0,260	+ 95,6	9,5	4,1	39
11	16,9	+ 0,579	+ 171,3	14,4	2,5	70
12	17,2	+ 0,706	+ 205,2	15,8	1,4	83,7
13	17,7	+ 0,748	+ 211,3	16,5	1,2	86,3
14	16,1	+ 0,699	+ 217,1	15,2	0,9	88,6
15	15,2	+ 0,678	+ 223	14,5	0,7	91
16	13,2	+ 0,579	+ 219,3	12,5	0,7	89,5
17	10,8	+ 0,469	+ 217,1	10,2	0,6	88,6
18	8,6	+ 0,373	+ 217	8,1	0,5	88,6
19	6,1	+ 0,277	+ 227	5,9	0,2	92,7
20	4,2	+ 0,189	+ 225	4	0,2	91,8
21	3,1	+ 0,143	+ 230,6	3	0,1	94,1
	288,2					82,8

Nach vier Durchläufen durch die Säule erhielt man auf dem Schreiberdiagramm zwei separate Elutionskurven der Mandelamidenantiomeren und zwei getrennte Massenpeaks der Refraktometerkurve (V 66/20a).

Rohdaten der Abdampfrückstände:

(R)-Mandelamid : 11,1 mg in 2 ml MeOH :

$$\alpha_{365} = -1,228^{\circ},\ [\alpha]_{365} = -221,3^{\circ} = 90,3\ \%$$

(S)-Mandelamid : 10,5 mg in 2 ml MeOH:

$$\alpha_{365} = +1,180^{\circ},\ [\alpha]_{365} = +224,8^{\circ} = 92\ \%$$

Chromatographische Prüfung der optischen Reinheit (R)-Mandelamid :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 67/20a$_R$	1	250	76x3,2	78,5	76	96,8	10B	B	2	

	1	11	12	13	14	15	16
V 67/20a$_R$	40	1840	14x20	g	365	2 MeOH	

(R, S)-Mandelamid :

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 68/20a	1	250	76x3,2	78,5	77	98	10B	B	2	

	1	11	12	13
V 68/20a	40	1840	29x20	

Das Schreiberdiagramm des (R)-Antipoden wies nur einen Drehwert und Massenpeak (V 67/20a$_R$) auf. Das Retentionsvolumen betrug 1980 ml. Ein Vergleich mit V 68/20a (gleiche Einwaage Racemat) ergab, daß beim Retentionsvolumen des (S)-Antipoden (2180 ml) kein Drehwert und keine Masse angezeigt wurde.

Daten des (R)-Enantiomeren (V 67/20a$_R$):

(R)-Mandelamid 9,6 mg in 2 ml MeOH: $\alpha_{365} = -1,172^{\circ}$, $[\alpha]_{365} = -244,1^{\circ}$

2. Isolierung des (-)-Antipoden eines Thalidomidanalogens 44

Schmp. Lit.[54] : 222 - 224 °C
Schmp. gef. : 222 °C

Daten nach einmaligem Durchlauf durch die Säule:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
V 69/44	2	65	62 x 2,4	100, 0	102,2	102	8 B	B	2

1	11	12	13	14	15	16	17	18
V 69/44	40	200	6 x 20	g	589	2 Dxn	d	43

Frakt.-Nr.	ES	α_{589}	$[\alpha]_{589}$	m_l	m_d	Ai+)
1	0, 7	- 0, 045	- 128, 5	0, 7	0	100
2	7, 1	- 0, 430	- 121, 1	6, 9	0, 2	95, 4
3	44, 8	- 0, 739	- 33	28, 2	16, 6	26
4	37, 1	+ 0, 853	+ 46	11, 8	25, 3	36, 2
5	11, 7	+ 0, 672	+ 114, 9	0, 6	11, 1	90, 5
6	0, 8	+ 0, 051	+ 127, 5	0	0, 8	100
	102, 2					Ag: 43

+) berechnet unter Zugrundelegung der ermittelten $[\alpha]_{589}$ - 127° (Dxn)

V 70/44

Daten siehe V 69/44; Einwaage 315 mg Racemat.

Die Fraktionen der (-)-Elutionskurve wurden vereinigt.
Auswaage: 140 mg

Diese angereicherte Probe wurde einer siebenmaligen Recyclingchromatographie unterzogen. Nach jedem Durchlauf wurden die jeweiligen Spitzenfraktionen dem Kreislauf entnommen und gesammelt (Peak-shaving).
Auswaage: 66 mg

Nach zweimaliger Umkristallisation aus ETOH (-)-Antipode: 40 mg

5,152 mg in 2 ml Dxn: $\alpha_{589} = -0,327^{o}$, $[\alpha]_{589} = -127^{o}$

3. HPLC Chromatographie von Mandelamid (20a)

V 71/20a

Adsorbens	- Poly [(S)-N-1-(1-ethoxycarbonyl-2-phenylethyl)-acrylamid]
Teilchengröße	- ungequollen 8 - 16 µm, gequollen 12 - 24 µm
Stahlsäule	- 0, 8 cm Durchmesser x 62 cm
Fließmittel	- Toluol : Dioxan 8 : 2
Druck	- 73 bar, bei Säulenfüllung 60 bar
Fließgeschwindigkeit	- 0, 1 ml/min
Racematmenge	- 1, 74 mg Mandelamid (aufgetragen in 300 µl Fließmittelgemisch)
Vorlauf	- 122 ml
substanzhaltige Fraktionen	- 14 x 2 ml
Detektion	-Differentialrefraktometer
Gehaltsbestimmung	- UV-spektroskopisch (259 nm; MeOH p. a.)

Die Substanz eluierte in zwei getrennten Massenpeaks (Refraktometerkurve). 1 Fraktion lag zwischen den Elutionskurven der Enantiomeren.

Die UV-spektroskopische Gehaltsbestimmung ergab:

1. Elutionskurve : 0, 813 mg Mandelamid
2. Elutionskurve : 0, 871 mg Mandelamid

1, 684 mg

Zwischenfraktion	0, 038 mg	=	2, 25 % der Gesamtmenge
nachgewiesene Substanz	1, 72 mg	=	98, 9 % der Einwaage

Literaturverzeichnis

1. R. Willstätter, Ber. Deut. Chem. Ges. 37, 3758 (1904)
2. V. Prelog und W. Wieland, Hel .Chim. Acta 27, 1127 (1944)
3. G.D.Y. Sogah und D.J. Cram, J. Am. Chem. Soc. 98, 3038 (1976)
4. V.A. Davankov und S.V. Rogozhin, J.Chromatogr. 60, 280 (1971)
5. F. Mikes, G. Boshart und E. Gil-Av, J. Chromatogr. 122, 205 (1976)
6. H. Krebs, J.A.Wagner und J. Diewald, Chem. Ber. 89, 1875 (1956)
   H. Krebs und W. Schumacher, Angew. Chem. 99, 1341 (1966)
7. H. Musso, Chem. Ber. 91, 349 (1958)
8. W. Mayer und F. Merger, Liebigs. Ann. Chem. 644, 65 (1961)
9. H. Franck, G.J. Nicholson und E. Bayer, J. Chromatogr. Sci. 15, 174 (1977); Angew. Chem. 90, 396 (1978); Angew. Chem. Int. Ed. 17, 363 (1978); J. Chromatogr. 146, 197 (1978)
10. G. Blaschke, Chem. Ber. 107, 232 (1974); Chem. Ber. 107, 237 (1974)
    G. Blaschke und F. Donow, Chem. Ber. 108, 1188 (1975); Chem. Ber. 108, 2792 (1975)
11. G. Blaschke und A.-D. Schwanghart, Chem. Ber. 109, 1967 (1976)
12. H.P. Kraft, Dissertation, Univ. Bonn (1978)
13. G. Hesse und R. Hagel, Chromatographia 6, 277 (1973); 9, 62 (1976); Liebigs Ann. Chem. 1976, 996; 1976, 277 (1973)
14. B.L. Karger in Modern Practice of Liquid Chromatography (Ed. J.J. Kirkland) Wiley Intersci., New York 1971
15. J. Knabe, private Mitteilung
16. Wisconsin Alumini Research Foundation (Erf. S. Preis, B.D. West und K.P. Link), US-Pat. 3, 239, 529 (8. March 1966)
    Chem. Abstr. 64, P 17547 efg (1966)
17. H. Koch und J. Kotlan, Monatsh. Chem. 97, 1648 (1966)
18. D. Craig,J. Am. Chem. Soc. 73, 4889 (1951)
19. W. Graf, E. Girod, E. Schmid und W.G. Stoll, Helv. Chim. Acta 42, 1085 (1959)
20. E.R. Garrett, J. Pharm. Sci. 49, 767 (1960); J.Am. Chem. Soc. 79, 3401 (1957)

21. G. Jommi, F. Mauri und G. Riva D.O.S., 2, 016, 810
Chem. Abstr. 74, P 22902 a (1971)
22. W.E. Müller und U. Wollert, Pharmaz. Ztg. 124, 835 (1979)
23. G. Jommi, A. Corbella und P. Gariboldi J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1973, 721
24. E. Husemann und R. Werner in Methoden der organischen Chemie (Houben-Weyl-Müller) Bd. 14/2 S. 875, Thieme, Stuttgart 1963
25. K. Bertsch und J.C. Jochims, Tetrahedron Lett. 1977, 4379
26. S. Kukolja, D. Grguric und L. Lopina, Croat. Chem. Acta 33, 41 (1961)
27. N. Finch, R. Dziemian, J. Cohen und B.G. Steinetz,Experientia 31, 1002 (1975)
28. K. Schmid, W. Riess und H. Keberle, Isotopes Exp. Pharmacol. 1965, 383
29. H. Keberle und K. Hoffmann, Experientia 12, 21 (1956)
30. K. Vogler und M. Kofler, Helv. Chim. Acta 39, 1387 (1956)
31. A.H. Luth und O. Schneider, Helv. Chim. Acta 39, 81 (1956)
32. H. Sobotka, M.F. Holzman und J. Kahn, J. Am. Chem. Sci. 54, 4697 (1932)
33. T.C. Butler und J. Waddell, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 110, 120 (1954)
34. T.C. Butler, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 104, 299 (1952)
35. T.C. Butler, J. Pharmacol. Exptl. Therap. 109, 340 (1953)
36. J. Knabe und W. Koch, Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.) 305, 757 (1972)
37. J. Knabe und W. Koch, Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.) 305, 849 (1972)
38. J. Knabe und K. Philipson, Arch. Pharm (Weinheim, Ger.) 299, 231 (1966)
39. J. Knabe und D. Strauß, Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.) 305, 54 (1972)
40. J. Knabe, H. Junginger und W. Geismar, Liebigs Ann. Chem. 739, 15 (1970)
41. H.P. Büch, W. Buzello, O. Neurohr und W. Rummel, Biochem. Pharmacol. 17, 2391 (1968)
42. J. Knabe und R. Kräuter, Arch. Pharm.(Weinheim, Ger.) 298, 1 (1965)
43. J. Knabe und D. Strauß, Angew. Chem. 80, 483 (1968)

44. D.D. Breimer und J.M. van Rossum, Europ. J. Pharmac. 26, 321 (1974)
45. H.P. Büch, F. Schneider-Affeld, W. Rummel und J. Knabe, Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 277, 191 (1973)
46. J. Knabe, H.P. Büch, V. Gradmann und I. Wolff, Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.) 310, 421 (1977)
47. H.P. Büch, W. Rummel und U. Brandenburger, Arch. exp. Path. Pharmak. 257, 270 (1967)
48. W. Rummel, U. Brandenburger und H.P. Büch, Med. Pharmac. exp. 16, 496 (1967)
49. J. Knabe, W. Rummel, H.P. Büch und N. Franz, Arzneim.-Forsch. 28, 1048 (1978)
50. J. Knabe und W. Geismar, Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.) 301, 682 (1968)
51. R. Hagel, Dissertation, Univ. Erlangen-Nürnberg (1976)
52. E. Fink, G. Minet und P. Nickel, Arzneim.-Forsch. 29, 163 (1979)
53. A. Haberkorn, H.P. Kraft und G. Blaschke, Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht
54. Dissertation U. Halfmann, Univ. Bonn (1977)
55. A.-D. Schwanghart, Dissertation, Univ. Kiel (1975)
56. R.V. Mac Allister, K.M. Harmon und C. Niemann, J. Biol. Chem. 177, 767 (1949)
57. F. Shealy, C. Oplinger und J. Montgomerey, J. Pharm. Sci. 57, 757 (1968)
58. E.G.C. Clarke, Isolation and Identification of Drugs, 1. Aufl., The Pharmaceutical Press, London 1968
59. G. Hesse und R. Hagel, Chromatographia 9, 62 (1976)
60. L.F. Andrieth und M. Sveda, Org. Synth. Coll. Vol. III. 536 (1955)
61. A. Mc Kenzie, G. Martin und H.G. Rule, J. Chem. Soc. (London) 105, 1583 (1914)
62. R. Anschütz und R. Bröcker, Liebigs. Ann. Chem. 368, 61 (1909)
63. A. Mc Kenzie und R.C. Strathern, J. Chem. Soc. 127, 87 (1925)
64. A. Mc Kenzie und A. Ritchie, Ber. Deut. Chem. Ges. 23, 29 (1937)

65. S.G. Cohen, R.M. Schultz und S.Y. Weinstein, J. Am. Chem. Soc. 88, 5318 (1966)
66. S. Kaufmann und H. Neurath, Arch. Biochem. 21, 437 (1949)
67. F. Nerdel und H. Liebig, Liebigs Ann. Chem. 621, 42 (1959)
68. A.-D. Schwanghart, W. Backmann und G. Blaschke, Chem. Ber. 110, 778 (1977)
69. H. Reihlen, G. v. Hessling, W. Hühn und W. Weinbrenner, Liebigs Ann. Chem. 493, 20 (1932)
70. I.A. Pearl und W.M. Dehn, J. Am. Chem. Soc. 60, 57 (1938)
71. W. Madelung und M.E. Oberwegner, Liebigs Ann. Chem. 526, 231 (1936)
72. G.W.K. Cavill, A. Robertson und W.B. Whalley, J. Chem. Soc. (London) 1949, 1567
73. C.A. Müller und L.M. Long, J. Am. Chem. Soc. 73, 4895 (1951)
74. J. Knabe und H. Junginger, Pharmazie 27, 443 (1972)
75. J. Knabe und N. Franz, Arch. Pharm. (Weinheim, Ger.) 308, 313 (1975)
76. Deutsches Arzneibuch 7 (1968), Kommentar, S. 529

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von September 1976 bis Februar 1979 am Pharmazeutischen Institut der Universität Bonn (Bonn-Endenich) -Direktor Prof. Dr. H. J. Roth - durchgeführt.

Herrn Professor Dr. Gottfried Blaschke danke ich herzlich für die Themenstellung, die mir gewährten Unterstützungen bei der Durchführung der Arbeit und rege Diskussionen.

Herrn Professor Dr. H. J. Roth danke ich für die wohlwollende Förderung dieser Arbeit.

Herrn Professor Dr. J. Knabe danke ich für die großzügige Überlassung der racemischen Barbitursäuren.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft danke ich für die finanzielle Unterstützung während des ersten Jahres.

Lebenslauf

28. Mai 1949	Geboren in Helmstedt Vater : Hermann Teiwes, Realschulkonrektor Mutter : Hildegard, geb. Schreiber
1956 - 1960	Besuch der Grundschule in Helmstedt
1960 - 1969	Besuch des Gymnasiums f. Mädchen in Helmstedt
5. Juni 1969	Abitur in Helmstedt
1969 - 1971	Apothekerpraktikantin in der Rats-Apotheke in Schöningen
16. September 1971	Pharmazeutische Vorprüfung in Braunschweig
April 1972	Immatrikulation an der TU Braunschweig, Studienfach : Chemie
Oktober 1972	Beginn des Pharmaziestudiums an der Universität Kiel
28. Dezember 1973	Heirat mit Dr. Hans-Otto Markgraf, Apotheker
12. Juli 1976	Pharmazeutisches Staatsexamen in Kiel
August 1976	Approbation als Apotheker
September 1976	Beginn der Promotion am Pharmazeutischen Institut Bonn
Dezember 1976 bis September 1977	Wissenschaftliche Angestellte bei der DFG
Oktober 1977 bis März 1978	Wissenschaftliche Hilfskraft
April 1978 bis März 1979	Verwalter der Dienstgeschäfte eines wissenschaftlichen Assistenten